

Vergleichende funktionelle Analyse des Adhäsions- und Invasionsfaktors YadA enteropathogener Yersinien

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Tanja Franziska Heise
aus Berlin

1. Referentin: Professor Dr. Petra Dersch
2. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn
eingereicht am: 10.10.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.12.2007
Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Eitel, J., Heise, T., Thiesen, U. and Dersch, P. (2005) Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YadA of *Yersinia pseudotuberculosis* require common signalling molecules (FAK, c-Src, Ras) and distinct cell factors. *Cell. Microbiol.* 7, 63-77.

Heise, T. and Dersch, P. (2006) Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103, 3375-80.

Heise, T. and Dersch, P. (2007) Enteropathogene Yersinien: Interaktion mit Wirtszellen – individuell, *BIOspektrum*, 03/2007, 258-259.

Tagungsbeiträge

Eitel, J., Heise, T. and Dersch, P. (2003) The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells (Poster), VAAM Jahrestagung, Berlin.

Eitel, J., Heise, T. and Dersch, P. (2004) The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates uptake and IL-8 production in human epithelial cells (Poster), VAAM Jahrestagung, Braunschweig.

Heise, T. and Dersch, P. (2004) Routes of invasion by enteropathogenic *Yersinia* (Vortrag), ZIBI-Forschungswochenende, Zeuthen.

Heise, T. and Dersch, P. (2005) Different virulence properties are attributable to highly homologous YadA proteins of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* (Poster), Cold Spring Harbor Meeting - Microbial Pathogenesis and Host Response, Cold Spring Harbor.

Heise, T., Kornprobst T. and Dersch, P. (2006) Bacterial and cellular determinants that contribute to YadA mediated invasion of *Yersinia pseudotuberculosis* (Poster), 9th International Symposium on *Yersinia*, Lexington.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Gattung <i>Yersinia</i>	2
1.2 Infektionsweg und Krankheitsbild enteropathogener Yersinien	2
1.3 Adhäsine und Invasine	4
1.3.1 Ail.....	5
1.3.2 pH6-Antigen	6
1.3.3 Invasin.....	6
1.3.4 YadA	8
1.3.4.1 Funktion	8
1.3.4.2 Struktur.....	9
1.3.4.3 Regulation.....	11
1.4 Antiphagozytäre Effektorproteine - Yops (<i>Yersinia</i> outer membrane proteins).....	12
1.5 Determinanten der eukaryotischen Wirtszelle für den bakteriellen Adhäsions- und Invasionsprozess	13
1.5.1 Zelladhäsionsmoleküle	14
1.5.2 Die extrazelluläre Matrix (EZM)	16
2. ZIELSETZUNG	19
3. MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 Material.....	20
3.1.1 Bakterienstämme, Medien und Kulturbedingungen	20
3.1.2 Plasmide	21
3.1.3 Oligonukleotide	22
3.1.4 Humane Zelllinie, Medien und Kulturbedingungen	24
3.2 Molekularbiologische Standardmethoden	24
3.2.1 Gerichtete Mutagenese	24
3.2.2 Konstruktion der <i>Y. pseudotuberculosis yadA</i> -Knockout-Mutante und Konstruktion weiterer <i>yadA</i> -Mutantenstämme	25
3.2.3 Konstruktion von <i>yadA</i> -Überexpressionsplasmiden	26
3.3 Biochemische Methoden.....	27
3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblotanalyse	27
3.3.2 Außenmembranpräparation	28
3.3.3 Überexpression und Reinigung von YadA-Proteinderivaten unter nativen Bedingungen	28
3.3.4 Analytische Größenausschlusschromatografie	29
3.3.5 YadA-Bindestudien an Proteine der extrazellulären Matrix	30
3.3.6 Untersuchung der Serumresistenz.....	31
3.3.7 Untersuchung der Autoagglutination	31

3.3.8	Untersuchung der Hämagglutination	31
3.3.9	Beschichtung von Latexkugeln mit YadA-Proteinderivaten	32
3.4	Zellbiologische Methoden	32
3.4.1	Adhäsions- und Invasionsassay	32
3.4.2	Invasionsassays mit beschichteten Latexkugeln	33
3.4.3	Herstellung von Ganzzellextrakten für die Immunoblotanalyse	34
3.4.4	IL-8-ELISA	35
3.5	Tierversuche	35
4.	ERGEBNISSE	37
4.1	Analyse von Funktions- und Strukturunterschieden von YadA aus <i>Y. pseudotuberculosis</i> und <i>Y. enterocolitica</i>	37
4.1.1	YadA-vermittelte Adhäsion und Invasion in eukaryotische Zellen ...	37
4.1.2	Charakterisierung struktureller Unterschiede von YadA _{pstb} und YadA _{ent}	38
4.2	Identifikation einer invasionsspezifischen Domäne in YadA _{pstb}	40
4.3	Funktionelle Analyse von Aminosäuren innerhalb der invasions- spezifischen Domäne von YadA _{pstb}	42
4.4	Bedeutung der Invasionsdomäne für weitere Virulenzeigenschaften von YadA _{pstb}	45
4.4.1	Auswirkungen auf die YadA-vermittelte Auto- und Hämagglu- tination	45
4.4.2	Auswirkungen auf die YadA-vermittelte Serumresistenz	47
4.4.3	Auswirkungen auf die IL-8-Sekretion	47
4.5	Charakterisierung der YadA _{pstb} -vermittelten Invasion	49
4.5.1	Analyse der Bindekapazitäten der YadA-Proteine an Proteine der extrazellulären Matrix	49
4.5.2	Analyse der Bedeutung verschiedener EZM-Moleküle und β_1 - Integrin-Klassen für die YadA-vermittelte Invasion	51
4.6	Bedeutung der YadA-vermittelten Invasion für den Infektionsprozess	54
4.7	Einfluss der invasionsdefizienten YadA-Proteine auf die Invasin- vermittelte Invasion	55
4.8	Funktionelle Analysen zur Kollagenbindedomäne in YadA	58
4.8.1	Identifizierte Kollagenbindemotive in YadA _{ent}	58
4.8.2	Analyse der Kollagenbindemotive in YadA _{pstb}	58
4.8.3	Identifikation von für die Kollagenbindung essentiellen Amino- säuren in YadA _{pstb}	61
4.9	Charakterisierung der Funktion der YadA-Kopfdomäne	64
4.9.1	Überexpression der YadA-Kopfdomäne	64
4.9.2	Analyse des Oligomerisierungszustandes der YadA-Kopf- Derivate	66
4.9.3	Beschichtung von Latexkugeln mit gereinigten YadA-Kopf- Derivaten	67

4.9.3.1	Analyse der von YadA-Kopf-Derivaten vermittelten Adhäsion und Invasion in eukaryotische Zellen	68
4.9.3.2	Analyse der Bindekapazitäten der YadA-Kopf-Derivate an Kollagen und Fibronectin	69
4.9.4	Analyse der durch YadA-Kopf-Derivate induzierten Signaltransduktion	70
4.9.5	Analyse der durch YadA-Kopf-Derivate induzierten IL-8-Sekretion.....	73
5.	DISKUSSION.....	75
5.1	Charakterisierung der YadA-vermittelten Adhäsion und Invasion	75
5.1.1	Identifikation der YadA _{pstb} -Invasionsdomäne.....	75
5.1.2	Identifikation an der YadA _{pstb} -vermittelten Invasion beteiligter wirtszellspezifischer Determinanten.....	79
5.1.3	Einfluss der Invasionsdomäne auf weitere YadA-vermittelte Virulenzeigenschaften	83
5.1.3.1	Autoagglutination und Hämagglutination.....	83
5.1.3.2	Serumresistenz	84
5.1.3.3	IL-8-Sekretion.....	85
5.1.4	Identifikation der Kollagenbindedomäne in YadA _{pstb}	86
5.1.5	Einfluss der invasionsdefizienten YadA-Derivate auf die Invasionsvermittelte Invasion	88
5.1.6	Bedeutung der YadA _{pstb} -Invasionsdomäne für die Virulenz	90
5.2	Bewertung der Anwendbarkeit löslicher YadA-Proteinderivate für die Analyse der eukaryotischen Signaltransduktion	92
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	95
7.	SUMMARY	97
8.	LITERATURVERZEICHNIS	99

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1:	In Epithelzellen einwandernde Yersinien.....	1
Abbildung 1.2:	Schematische Darstellung des Infektionswegs von <i>Y. pseudotuberculosis</i>	3
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung der Aufnahme von Yersinien nach dem Zipper-Mechanismus.....	5
Abbildung 1.4:	Kristallstruktur des Außenmembranproteins Invasin aus <i>Y. pseudotuberculosis</i>	7
Abbildung 1.5:	Das Außenmembranprotein YadA aus <i>Y. enterocolitica</i>	10
Abbildung 1.6:	Invasions- und Überlebensstrategie enteropathogener Yersinien.....	13
Abbildung 1.7:	Integrin mit intra- und extrazellulären Verknüpfungen.....	15
Abbildung 1.8:	Schematische Darstellung der extrazellulären Matrix und transmembranen Integrine einer eukaryotischen Zelle.....	16
Abbildung 1.9:	Schematische Darstellung verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix.....	18
Abbildung 3.1:	Schematische Darstellung der gerichteten Mutagenese durch 2-Schritt-PCR.....	25
Abbildung 4.1:	Vergleich der Adhäsions- und Invasionsfähigkeit von YadA aus <i>Y. pseudotuberculosis</i> und <i>Y. enterocolitica</i>	38
Abbildung 4.2:	Aminosäurevergleich von YadA aus <i>Y. enterocolitica</i> Sero- typ O:3, O:8 und O:9 und <i>Y. pseudotuberculosis</i> Typ III.....	39
Abbildung 4.3:	YadA-Expression in der Außenmembran und YadA-vermit- telte Adhäsion und Invasion.....	41
Abbildung 4.4:	YadA-Expression in der Außenmembran und YadA-vermit- telte Adhäsion und Invasion.....	44
Abbildung 4.5:	Autoagglutination, Biofilmbildung und Hämagglutination YadA-exprimierender Bakterien.....	46
Abbildung 4.6:	Induktion der IL-8-Sekretion.....	48
Abbildung 4.7:	Bindekapazitäten YadA-exprimierender Bakterien an verschiedene Proteine der EZM.....	50
Abbildung 4.8:	Einfluss inhibierender Antikörper gegen EZM-Moleküle und Integrine auf die YadA-vermittelte Invasion.....	53
Abbildung 4.9:	Bedeutung der YadA _{pstb} -Invasionsdomäne für den Infektionsprozess.....	55
Abbildung 4.10:	Vereinfachte Illustration von YadA und Invasin aus <i>Y. pseudotuberculosis</i> und <i>Y. enterocolitica</i>	56
Abbildung 4.11:	Invasion bei gleichzeitiger Expression von YadA und Invasin aus <i>Y. pseudotuberculosis</i> und <i>Y. enterocolitica</i>	57
Abbildung 4.12:	Expression in der Außenmembran, Adhäsions- und Invasionseigenschaften und Kollagenbindefähigkeiten verschiedener YadA-Mutanten.....	59

Abbildung 4.13:	Expression in der Außenmembran und Adhäsions- und Invasionseigenschaften der YadA-Mutanten V133D, N134A..	62
Abbildung 4.14:	EZM-Bindeeigenschaften der YadA-Mutanten V133D, N134A.....	63
Abbildung 4.15:	Kennzeichnung und Darstellung der kristallisierten YadA-Kopfdomäne.....	64
Abbildung 4.16:	Überexpression und Reinigung der YadA-Kopfdomäne.....	65
Abbildung 4.17:	Analytische Größenausschlusschromatografie der YadA-Proteinderivate.....	66
Abbildung 4.18:	Internalisierung von mit YadA-Kopf-Derivaten beschichteten Latexkugeln in HEp-2 Zellen.....	68
Abbildung 4.19:	Bindevermögen mit YadA-Kopf-Derivaten beschichteter Latexkugeln an Kollagen und Fibronektin.....	70
Abbildung 4.20:	Zeitabhängige Phosphorylierung der FAK und der p44/42 Kinasen.....	72
Abbildung 4.21:	Induktion der IL-8-Sekretion bei Infektion mit den YadA-Kopf-Derivaten.....	74
Abbildung 5.1:	Modell zur Bindung von Fibronektin (Fn) und Kollagen (Ko) in der YadA-Kopfregion.....	80
Abbildung 5.2:	Modell der Interaktion verschiedener YadA-Proteine mit eukaryotischen Wirtszellen.....	83
Abbildung 5.3:	Modell zur Exposition von Kollagenbindestellen in der YadA-Kopfregion.....	87

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1:	Bakterienstämme.....	20
Tabelle 3.2:	Plasmide.....	21
Tabelle 3.3:	Oligonukleotide.....	22
Tabelle 4.1:	Übersicht der YadA _{pstb} -Punktmutanten und ihrer Adhäsions- und Invasionsfähigkeiten.....	42
Tabelle 4.2:	Serumresistenz YadA-exprimierender Bakterien.....	47

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCIP	5-Brom-4-Chloro-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serum Albumin
Cm	Chloramphenicol
Δ	Deletion
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DYT	Double Yeast Trypton
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extrazellullarsignal regulierte Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
FnBP	Fibronektin-Bindeproteine
g	Gramm
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactopyranosid
IL	Interleukin
k	Kilo
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
μg	Mikrogramm
mA	Milliampere
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
nm	Nanometer
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsals
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
P	Phosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLC	Phospholipase C
PKC	Phosphokinase C
RPMI	Zellmedium (Roswell Park Memorial Institute)
SDS	Natriumdodekylsulfat
TAA	Trimere Autotransporter-Adhäsine
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Saline

Tn	Transposon
upm	Umdrehungen pro Minute
wt	Wildtyp

Abkürzungen von Aminosäuren

A	Ala	Alanin
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
V	Val	Valin
Y	Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

Bei der Besiedlung und Infektion des Wirts durch pathogene Bakterien stellt die Adhäsion an Wirtszellen den ersten wichtigen Schritt dar. Sie ist notwendig, um der schnellen Eliminierung durch wirtseigene Mechanismen wie beispielsweise peristaltische und ziliäre Bewegungen sowie Sekretbildung zu entgehen. Als Adhäsine werden sowohl filamentöse Oberflächenstrukturen wie Pili und Fimbrien als auch afimbriäre Oberflächenstrukturen bezeichnet. Sie sind in der Lage, direkt an Zellmoleküle wie Membranrezeptoren oder Strukturen der extrazellulären Matrix zu binden. Eine Vielzahl von Adhäsinen kann zudem die Internalisation der Bakterien auslösen. In diesem Fall werden verschiedene Signaltransduktionswege in der Zelle aktiviert, die zu einer Rearrangierung des Aktinzytoskeletts führen und die Bildung von pseudopodienähnlichen Ausläufern bzw. Membranfalten induzieren (siehe Abbildung 1.1) (Oelschlaeger, 2001; Cossart & Sansonetti, 2004).

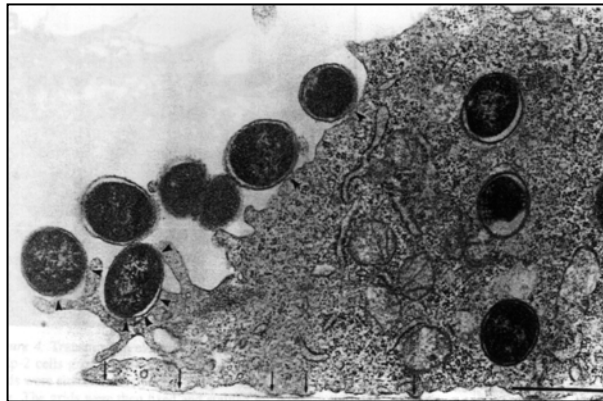


Abb. 1.1: In Epithelzellen einwandernde Yersinien. Nach der Adhäsion werden die Bakterien von Pseudopodien der Epithelzellen umschlossen und aufgenommen.

Vier adhäsive Faktoren wurden bisher für die enteropathogenen Bakterien *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* beschrieben: Invasin, YadA, Ail und das pH6-Antigen (Isberg, 1996). Diese Adhäsionsmoleküle - schwerpunktmäßig das YadA-Protein - und weitere Pathogenitätsdeterminanten der Gattung *Yersinia*, sowie ihre Rolle bei den von diesen Bakterien ausgehenden Krankheiten, werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

1.1 Die Gattung *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia* ist nach ihrem Entdecker, dem Bakteriologen Alexandre Yersin, benannt. Er isolierte 1894 aus den Beulen von Pestleichen den Erreger der Pest, das Bakterium *Yersinia pestis*. Neben *Y. pestis* besteht die Gattung aus zehn weiteren Spezies. Von diesen sind sieben apathogen, *Yersinia ruckeri* fischpathogen und die beiden Spezies *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* human- und tierpathogen (Wren, 2003). Yersinien sind weltweit verbreitet, kommen aber nahezu ausschließlich in den gemäßigten und subtropischen Gebieten Europas, Nord-, Zentral- und Ostasiens, Australiens, Südafrikas, Nord- und Südamerikas vor. Phylogenetisch werden sie der Familie der Enterobacteriaceae aus der γ -Gruppe der Proteobakterien zugeordnet. Sie sind gramnegativ, stäbchenförmig, bei moderaten Temperaturen begeißelt und psychrotolerant, wobei ihr Wachstumsoptimum zwischen 20 und 30°C liegt. Die Sequenzierung der Genome von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* zeigte eine Homologie von annähernd 97 %. Demnach ist *Y. pestis* vor 1500 bis 20000 Jahren aus *Y. pseudotuberculosis* in einem Prozess, bestehend aus der Inaktivierung und dem Erwerb von Genen durch lateralen Transfer hervorgegangen (Achtman *et al.*, 1999, 2004; Wren, 2003). *Y. enterocolitica* weist genetisch weniger als 75 % Sequenzähnlichkeit zu *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* auf und entstammt einer weiter entfernten evolutionären Linie (Parkhill & Thomson, 2003). Die drei humanpathogenen Spezies unterscheiden sich in ihrer Virulenz und in den von ihnen ausgelösten Krankheiten. Sie vermehren sich jedoch alle präferentiell in lymphatischem Gewebe und besitzen die Fähigkeit, sich der unspezifischen Immunabwehr des Wirtes zu entziehen (Straley *et al.*, 1993; Naktin & Beavis, 1999; Grosdent *et al.*, 2002).

1.2 Infektionsweg und Krankheitsbild enteropathogener Yersinien

Die beiden enteropathogenen Arten *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* werden in einer Vielzahl von Wild-, Heim- und Nutztieren (z. B. Nager, Hasen, Vögel, Schweine) gefunden und fäkal-oral durch verunreinigtes Wasser oder Nahrungsmittel auf den Menschen übertragen. Sie gelangen so in den terminalen Abschnitt des Ileums, der in dem Bereich des darmassoziierten lymphatischen

Gewebes (v. a. den Peyerschen Plaques) keine Darmzotten aufweist, sondern aus follikelassoziiertem Epithel besteht (siehe Abbildung 1.2). Dieses wird von Saumzellen und vereinzelt membranösen Epithelzellen, den so genannten M-Zellen, gebildet, die zur Pinozytose und Transzytose von Proteinen, Partikeln und Mikroorganismen befähigt sind. Die M-Zellen werden von Pathogenen wie *Yersinia*, aber auch *Shigella* oder *Salmonella*, als Portal für die Invasion in die intestinale Mukosa ausgenutzt. Es erfolgt eine Translokation der Mikroorganismen von luminal nach basal, wo sich Makrophagen, polymorphkernige Neutrophile, dendritische Zellen und B-Zellen befinden, die die Mikroorganismen erkennen und eliminieren (Bockman & Cooper, 1973; Vazquez-Torres & Fang, 2000). Als Reaktion auf das Anheften und Eindringen enteropathogener Bakterien schütten Darmepithelzellen verschiedene proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-8 (IL-8) aus (Eckmann *et al.*, 1995). Dieses stellt einen wichtigen Lockstoff für die polymorphkernigen Leukozyten (PMNs) dar, die dadurch in großen Mengen an den Infektionsherd rekrutiert werden. Auch die Immunreaktion unterstützenden Monocyten infiltrieren die Peyerschen Plaques.

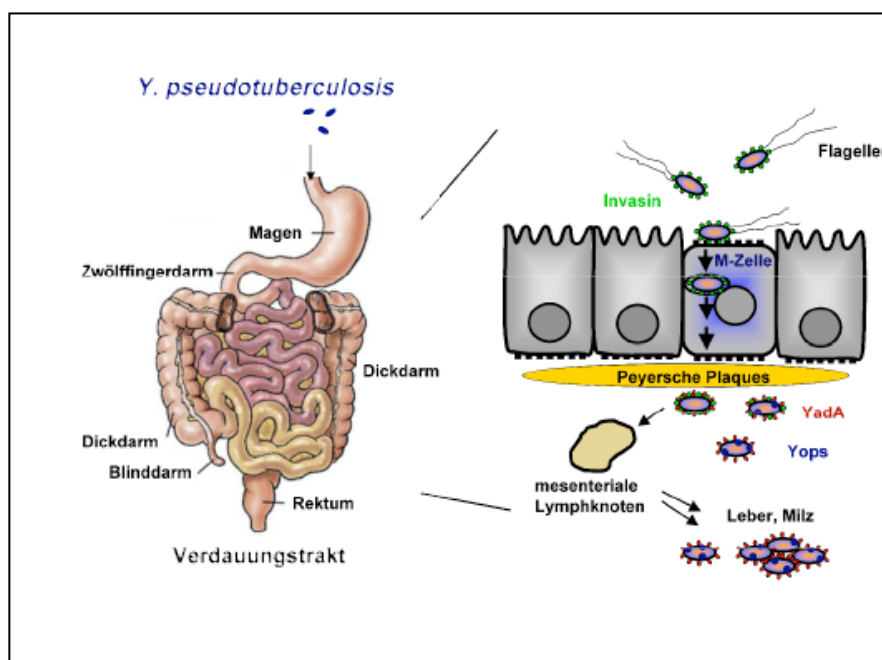


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Infektionswegs von *Y. pseudotuberculosis*. In der linken Bildhälfte ist der Gastrointestinaltrakt in seiner Gesamtheit, rechts ein Ausschnitt aus dem terminalen Ileum dargestellt. Weitere Erläuterungen im Text.

Yersinien allerdings unterdrücken und verhindern mittels der Expression und Sekretion antiphagozytärer Proteine die primäre Immunantwort und Phagozytose durch die angelockten Immunzellen. So können sie sich in den Peyerschen

Plaques extrazellulär vermehren (Hanski *et al.*, 1989; Grützkau *et al.*, 1990; Autenrieth & Firsching, 1996) und gelangen durch abfließende Lymphgefäße oder direkt vom Darm in mesenteriale Lymphknoten, Leber, Milz und Nieren sowie in wenigen Fällen in die Blutbahn (Holmstrom *et al.*, 1995; Marra & Isberg, 1996, Barnes *et al.*, 2006).

In Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Verfassung der Patienten verursachen enteropathogene Yersinien eine Reihe unterschiedlicher Erkrankungen. Enterale Yersiniosen können sich in drei klinischen Formen manifestieren: 1) Enteritis, 2) terminale Ileitis oder mesenteriale Lymphadenitis mit den Symptomen einer Pseudoappendizitis, 3) Septikämie mit Abszedierung in Milz und Leber (Bockemühl *et al.*, 2002, 2004). Als Folgeerkrankung einer intestinalen Infektion mit *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* treten bei 20 % der Infizierten extraintestinale, immunologisch bedingte Krankheitsbilder auf, die sich als Arthritis, Arthralgien, Myokarditis, Erythema nodosum und reaktive Arthritis äußern (Cover & Aber, 1989; Bottone, 1997). Ihr Auftreten ist deutlich mit dem des Histokompatibilitätsantigens HLA-B27 assoziiert. Die unkomplizierten intestinalen Infektionen mit *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* bedürfen in der Regel keiner antibiotischen Behandlung.

1.3 Adhäsine und Invasine

Die Adhäsion an die eukaryotischen Zellen ist ein wichtiger Schritt bei der Etablierung einer Infektion. Sie dient nicht nur der Assoziation der Bakterien mit der Wirtszelle, sondern kann auch den phagozytotischen Aufnahmeprozess durch Wirtszellen einleiten. Verschiedene Bakterien haben molekulare Strategien entwickelt, um ihre Internalisation zu induzieren. Die Invasion kann entweder durch direktes oder indirektes Binden von Wirtszellrezeptoren oder durch die Translokation von bakteriellen Faktoren in das Wirtszytosol und die dadurch jeweils ausgelöste Rearrangierung des Aktinzytoskeletts ausgelöst werden (Pizarro-Cerda *et al.*, 2006). Enteropathogene Yersinien verfolgen die erstgenannte Strategie, die auch als Reißverschluss- oder Zippermechanismus bezeichnet wird: Nach der Bindung des adhäsiven und invasiven Außenmembranproteins Invasin an β_1 -Integrin-Rezeptoren der Wirtszelle werden, wie in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt, die Bakterien von sich ausstülpenden

Pseudopodien nach und nach umschlossen und schließlich als bakterielles Phagosom internalisiert (Isberg *et al.*, 1989, 2000; Swanson *et al.*, 1995). Dabei stellen die M-Zellen eine Eintrittspforte für die Bakterien dar, da sie, im Gegensatz zu anderen Darmepithelzellen, β_1 -Integrin-Rezeptoren auf ihrer luminalen Seite exprimieren (Clark *et al.*, 1998).

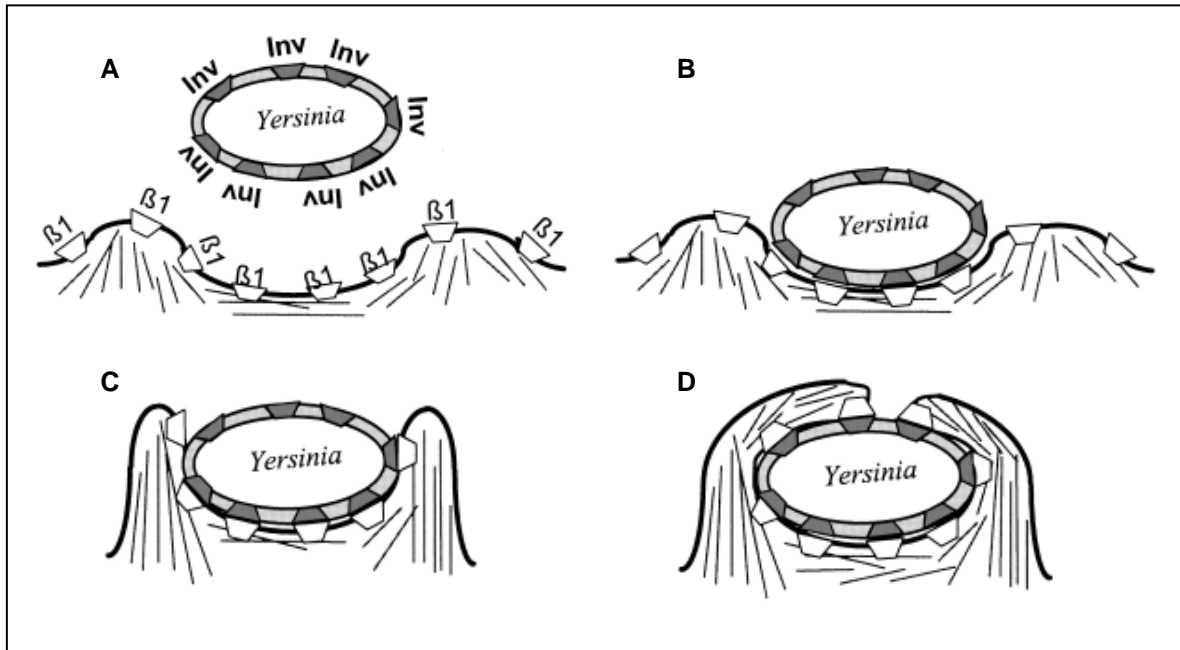


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Aufnahme von Yersinien nach dem Zipper-Mechanismus. (A, B) Das Außenmembranprotein Invasin interagiert mit den β_1 -Integrin-Rezeptoren der Wirtszelle. (C, D) Die Pseudopodien umwandern das Bakterium, wobei weitere Rezeptoren rekrutiert werden, bis es zur völligen Umschließung und Aufnahme kommt (nach Oelschlaeger, 2001)

Die bisher in *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* identifizierten Adhäsions- und Invasionsmoleküle werden im Folgenden vorgestellt.

1.3.1 Ail

Das 17 kDa große Ail-Protein von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* ist ein integrales Außenmembranprotein, das Adhäsion und wenig effiziente Invasion in bestimmte Säugetierzelllinien vermittelt (Miller & Falkow, 1988; Scharf, 2004). Zusätzlich schützt es gegen den bakteriolytischen Effekt des Serums (Bliska & Falkow, 1992; Pierson & Falkow, 1993). Es ist chromosomal kodiert und wird bei 37°C unter guten Nährstoffbedingungen in der stationären Wachstumsphase gebildet (Bliska & Falkow, 1992; Scharf, 2004). Zwar wird es in allen humanpathogenen *Yersinia* Spezies exprimiert, da aber *ail*-Mutanten einen nur

wenig veränderten Phänotyp zeigen, konnte die Bedeutung von Ail für die Virulenz bisher nicht geklärt werden (Miller *et al.*, 1989; Wachtel & Miller, 1995; Isberg, 1996).

1.3.2 pH6-Antigen

Das pH6-Antigen aus *Y. pseudotuberculosis* bzw. sein Homolog Myf aus *Y. enterocolitica* besteht aus 16 kDa Pilus-ähnlichen PsaA-Untereinheiten. Es ist chromosomal kodiert und vermittelt sowohl Zelladhäsion als auch Hämagglutination. Darüber hinaus hat es gegenüber Makrophagen antiphagozytäre Eigenschaften. Es wird nur bei 37°C und niedrigem pH exprimiert, so dass eine Bedeutung der Fibrillen des pH6-Antigens für das Überleben im Phagolysosom angenommen wird (Yang *et al.*, 1996; Yang & Isberg, 1997; Huang & Lindler, 2004). Derzeit ist noch wenig über die genaue Funktion des pH6-Antigens während des Infektionsverlaufs bekannt, jedoch hat der Verlust von *psaA* in *Y. pestis* eine signifikante Attenuation der Virulenz im Mausmodell zur Folge und lässt so eine wichtige Rolle des pH6 Antigens vermuten (Cathelyn *et al.*, 2006).

1.3.3 Invasin

Invasin ist der effizienteste Internalisierungsfaktor enteropathogener Yersinien (Isberg & Falkow, 1985). Dieses chromosomal kodierte, in *Y. pseudotuberculosis* 103 kDa große Protein ist N-terminal in der bakteriellen Außenmembran verankert. Der C-Terminus bildet fünf exponierte β -Faltblatt Domänen (D1-D5) (siehe Abbildung 1.4, Hamburger *et al.*, 1999), wobei die Domänen D4 und D5 essentiell für die Adhäsion und Invasion in Wirtszellen sind und daher als Zelladhäsions- und Invasionsdomäne bezeichnet werden (Dersch & Isberg, 1999). Sie vermitteln eine hochaffine Bindung an fünf verschiedene $\alpha\beta_1$ -Integrin-Rezeptoren der Wirtszelle (Isberg & Leong, 1990). Durch die Analyse von Punktmutationen innerhalb dieser Domänen konnten zwei für die Integrinbindung wichtige Aminosäuren identifiziert werden: Die Aspartate an den Positionen 911 und 811, wobei vor allem das Asp⁹¹¹ essentiell für die Interaktion mit den Integrinen ist (Leong, *et al.*, 1995; Saltman *et al.*, 1996). Darüber hinaus ist die Domäne D2 von besonderer Bedeutung für die Invasivität des Invasin-Proteins.

Sie besitzt die Fähigkeit zur Selbstassoziation und kann daher die Bildung von Invasin-Multimeren in der Außenmembran induzieren. Dies resultiert in direkter Wechselwirkung mit den Rezeptoren der Wirtszelle in einem Clustering der Integrine. Wahrscheinlich werden dadurch Signaltransduktionswege verstärkt, die zur Umlagerung des Zytoskeletts führen und den Invasionsvorgang einleiten (Dersch & Isberg, 1999). Dem Invasin von *Y. enterocolitica*, das eine deutlich schwächere Aufnahme in die Zelle vermittelt, fehlt die Domäne D2 und somit die Fähigkeit Invasin-Multimere auszubilden (Young *et al.*, 1990, Dersch & Isberg, 2000).

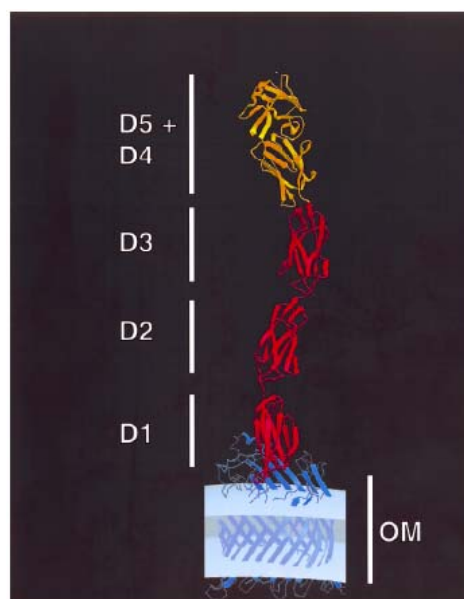


Abb. 1.4: Kristallstruktur des Außenmembranproteins Invasin aus *Y. pseudotuberculosis*. Invasin besteht aus fünf Domänen, wobei der N-Terminus in der Außenmembran verankert ist. D1-D4 zeigen Immunglobulin-ähnliche Faltstrukturen. D5 bildet eine C-Typ-Lektin-ähnliche Domäne aus. D4 und D5 stellen die Adhäsions- und Invasionsdomäne des Proteins dar (Isberg *et al.*, 2000).

Die Expression des *inv*-Gens erfolgt streng umweltskontrolliert bei moderaten Temperaturen, niedriger Osmolarität, in der stationären Wachstumsphase und in nährstoffreichem Medium (Ellison *et al.*, 2004; Isberg *et al.*, 1988; Nagel *et al.*, 2001; Pepe *et al.*, 1994). Sie wird durch den transkriptionellen Aktivator RovA induziert und durch das DNA-bindende Protein H-NS reprimiert (Nagel *et al.*, 2001; Heroven *et al.*, 2004). RovA agiert als globaler Regulator und hat weitere wichtige Funktionen für die Virulenz enteropathogener Yersinien, z. B. in Form der Vermittlung von Resistenz gegen Hitze und oxidativen Stress (Nagel *et al.*, 2003). Die letale Dosis (LD₅₀) einer *Y. enterocolitica* *rovA*-Mutante ist im Tierversuch im Gegensatz zum Wildtyp um das 70fache erhöht (Dube *et al.*, 2003; Nagel *et al.*,

2001; Pepe & Miller, 1993; Revell & Miller, 2001) und auch in *Y. pestis* führt der Verlust des *rovA*-Gens, unabhängig vom Fehlen des *inv*-Gens, zu einer deutlichen Abschwächung der Virulenz (Cathelyn *et al.*, 2006). Die Produktion des Invasins bei Bedingungen, die der Situation außerhalb des Wirtes entsprechen, lässt auf eine Rolle dieses Proteins zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion schließen. Invasin gewährleistet vermutlich die frühzeitige Anheftung an und schnelle Invasion in M-Zellen (Dersch & Isberg, 2000).

1.3.4 YadA

1.3.4.1 Funktion

Y. pseudotuberculosis und *Y. enterocolitica* exprimieren das auf dem Virulenzplasmid kodierte Außenmembranprotein YadA. YadA, früher auch Yop1 oder P1 genannt, steht für „*Yersinia* adhesin A“ (Bolin *et al.*, 1982; Bölin & Wolf-Watz, 1984; Balligand *et al.*, 1985). Als Hauptadhäsin enteropathogener Yersinien vermittelt es Adhärenz an Epithelzellen (Heesemann & Gruter, 1987), professionelle Phagozyten (Roggenkamp *et al.*, 1996) und verschiedene Moleküle der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Kollagen, Laminin und Fibronektin (Emödy *et al.*, 1989; Schulze-Koops *et al.*, 1992, 1993; Terti *et al.*, 1992; Flügel *et al.*, 1994). Darüber hinaus hat YadA weitere vielfältige Funktionen. Es schützt die Yersinien vor dem bakteriolytischen Effekt des humanen Serums, indem es an den Komplementfaktor H bindet. Dadurch kommt es zu einer Inaktivierung des Komplementfaktors C3b und zu einer Reduktion der Ausbildung der Membran-Angriffskomplexe auf der Oberfläche der Bakterien (China *et al.*, 1994; Pilz *et al.*, 1992). Weitere protektive Aufgaben erfüllt es durch die Bindung an Makrophagen und Neutrophile, wodurch die Translokation der antiphagozytären Yop-Effektoren in diese Zellen ermöglicht und so die Eliminierung der Bakterien verhindert wird (Rosqvist, 1994; Ruckdeschel *et al.*, 1996). Zusätzlich wird durch YadA die Hemmung des antiinvasiven Effekts von Interferon vermittelt (Bukholm *et al.*, 1990). Die Autoagglutination von Yersinien ist auf die Interaktion von YadA Molekülen zurückzuführen (Hoiczky *et al.*, 2000; El Tahir & Skurnik, 2001). Sie hat insofern infektionsbiologische Bedeutung, als dass sie die Bildung von Mikrokolonien und Mikroabszessen in lymphatischen Geweben und Organen, insbesondere in Leber

und Milz, induzieren kann. YadA ist darüber hinaus in der Lage, mit Erythrozyten in Wechselwirkung zu treten, so dass bei YadA-exprimierenden Bakterien der Effekt der Hämagglutination zu beobachten ist (Kapperud *et al.*, 1985).

YadA aus *Y. pseudotuberculosis* vermittelt eine höchst effiziente Invasion in eukaryotische Zellen, indem es über Fibronectin in einem so genannten Brückenmechanismus an β_1 -Integrine bindet. Infolgedessen wird in der Wirtszelle ein Signaltransduktionsweg induziert, der zur Ausbildung von Pseudopodien und zu einer Internalisierung YadA-exprimierender Bakterien führt (Eitel & Dersch, 2002). Einige der beteiligten Signalmoleküle konnten bereits identifiziert werden. So löst YadA die Bildung eines FAK-Src-Komplexes und die darauf folgende Aktivierung von Ras aus, die den Invasionsprozess über die Signalmoleküle Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), Phospholipase C (PLC) und Phosphokinase C (PKC) vermittelt (Eitel *et al.*, 2005; Eitel & Kornprobst, unveröffentlichte Daten).

1.3.4.2 Struktur

YadA ist ein afimbriäres Adhäsion, das den Prototyp der neu definierten Adhäsion-Klasse der „Trimeren Autotransporter-Adhäsine“ (TAA) darstellt, die auch als Oca-Proteinfamilie bezeichnet wird (Roggenkamp *et al.*, 2003; Barocchi *et al.*, 2005, Linke *et al.*, 2006). Zu ihr gehören Adhäsine aus *Neisseria meningitidis* (NadA), *Moraxella catarrhalis* (Hag, UspA1, 2), *Bartonella henselae* (BadA), *Bartonella quintana* (VompABCD), *Haemophilus ducreyi* (DsrA) und *Haemophilus influenzae* (Hia, Hsf). Diese zeichnen sich durch ein N-terminales Signalpeptid, eine interne Passenger-Domäne mit adhäsiven Eigenschaften und eine kurze C-terminale Translokator-Domäne aus, die in die Außenmembran inseriert und den Transport der Passenger-Domäne auf die bakterielle Oberfläche ermöglicht. Im Unterschied zu konventionellen Autotransportern besteht die C-terminale Translokator-Domäne, der sog. „Anker“, aus einem Trimer von vier β -Faltblättern und nicht aus einer einzelnen, die Pore formenden Einheit von 12 β -Faltblättern. Die Passenger-Domäne dient als Stiel-ähnliches Zwischensegment, das in einer „Nacken“-Region in die N-terminale ovale Kopfdomäne mündet (siehe Abbildung 1.5 A). Da der Stiel und Kopf aus einer unterschiedlichen Anzahl sich wiederholender

kleinerer Domänen bestehen, sind TAAs grundsätzlich sehr variabel in ihrer Größe (Hoiczky *et al.*, 2000; Cotter *et al.*, 2005, 2006).

YadA ist in Abhängigkeit von Spezies und Serotyp 160-250 kDa groß (El Tahir und Skurnik, 2001), während BadA aus *B. henselae* als bisher größter der identifizierten TAAs, aus über 3000 Aminosäuren besteht (Linke *et al.*, 2006). Die Kristallisierung der Kopfdomäne inklusive der Nackenregion von YadA aus *Y. enterocolitica* zeigte, dass diese Domäne eine neuartige, links gedrehte β -Rolle bildet, die eine sehr stabile oligomere *lock nut* Struktur aufweist. Der hydrophobe Kern der Domäne wird von acht repetitiven NSVAIG-S Motiven ausgebildet (Nummelin *et al.*, 2004).

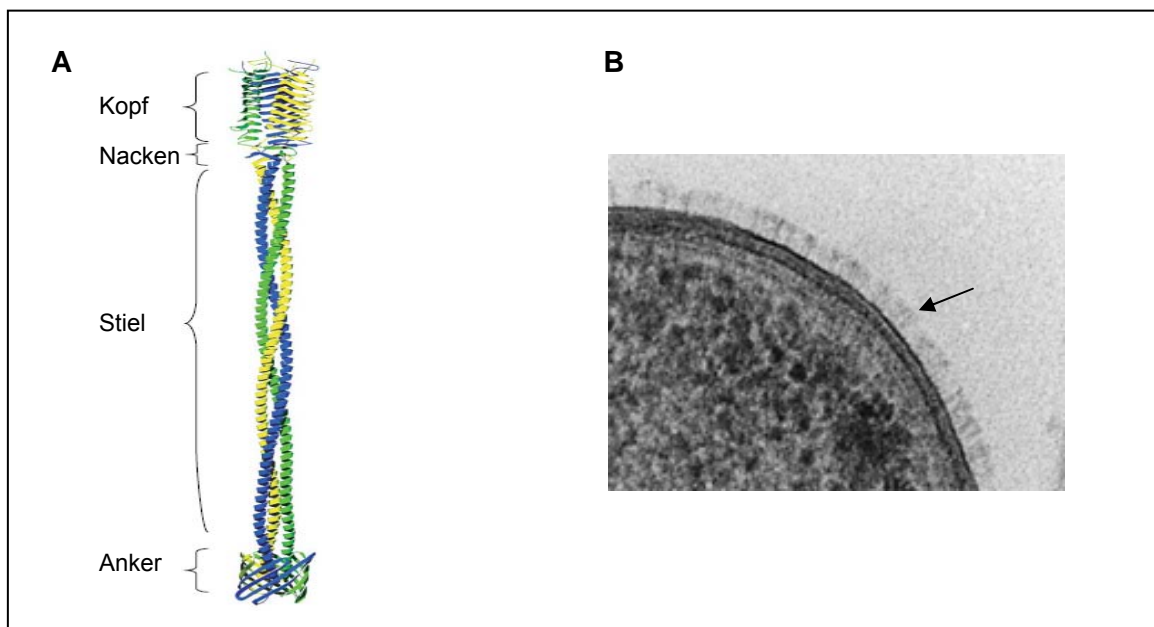


Abb. 1.5: Das Außenmembranprotein YadA aus *Y. enterocolitica*. (A) Modellstruktur nach Linke *et al.*, (2006). (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Lollipop-artigen, von YadA ausgebildeten Oberflächenstrukturen (Hoiczky *et al.*, 2000).

Wird YadA auf der bakteriellen Außenmembran exprimiert, bedeckt es die Bakterienzellen mit „Lollipop“-ähnlichen Strukturen wie eine Kapsel (siehe Abbildung 1.5 B). In *Y. enterocolitica* wurden verschiedene YadA-Mutanten konstruiert, um die diversen funktionellen Eigenschaften des Proteins den verschiedenen Domänen zuordnen zu können. Die extreme N-terminale Region vermittelt demnach die Bindung an Neutrophile, während der mehr proximale Teil dieser Domäne für die Reißverschluss-ähnliche Interaktion der Moleküle bei der Autoagglutination und dem Binden an EZM-Proteine verantwortlich ist (Tamm *et al.*, 1993; Roggenkamp *et al.*, 1996). Der C-terminale Teil von YadA ist neben der Verankerung für die allgemeine Stabilität und die Oligomerisierung des Moleküls

verantwortlich. Bisher konnte kein Aminosäurebereich als essentiell für die Serumresistenz identifiziert werden, auch wenn deutlich wurde, dass die Kopf- und Nackendomäne für diesen protektiven Mechanismus keine Bedeutung haben (Roggenkamp *et al.*, 2003).

1.3.4.3 Regulation

Das *yadA*-Gen wird von einem klassischen σ^{70} -Promotor transkribiert, der ca. 270 bp stromaufwärts des Startkodons lokalisiert ist (Skurnik & Wolf-Watz, 1989). Dabei unterliegt die *yadA*-Expression einer strengen und effektiven Umweltkontrolle: YadA wird nur bei 37°C während des exponentiellen Wachstums gebildet (Skurnik, 1985; Eitel & Dersch, 2002) und ist bereits zwei Minuten nach einer Temperaturerhöhung detektierbar (Bölin & Wolf-Watz, 1982; Kapperud *et al.*, 1985). Analysen konnten zeigen, dass die *yadA*-Expression unabhängig von der Umgebungstemperatur auch durch den Kontakt an eukaryotische Zellen induziert wird (Eitel & Fehse, unveröffentlichte Daten). Die YadA-Synthese wird durch den AraC-ähnlichen transkriptionellen Aktivator VirF reguliert (Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992; Skurnik & Toivanen, 1992). VirF (LcrF in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*) selbst ist ebenfalls temperaturreguliert, wobei das Nukleoid-assoziierte Protein YmoA bei 25°C als Repressor agiert. Bei 37°C wird YmoA proteolytisch abgebaut (Jackson *et al.*, 2004; Boehme, unveröffentlichte Daten). Darüber hinaus bildet die *virF*-mRNA bei moderaten Temperaturen stabile Sekundärstrukturen aus, die eine Bindung der Ribosomen verhindern. Infolge einer Temperaturerhöhung wird die Sekundärstruktur aufgeschmolzen und so die Translation ermöglicht (Hoe & Goguen 1993; Konkel & Tilly, 2000). Auch Temperatur-induzierte Veränderungen der DNA-Topologie des *yadA*-Promotors könnten als weiterer Faktor bei der Expressionskontrolle von Bedeutung sein (Cornelis *et al.*, 1991; Cornelis, 1993; Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992).

1.4 Antiphagozytäre Effektorproteine – Yops (*Yersinia* outer membrane proteins)

Alle drei humanpathogenen *Yersinia* Spezies besitzen ein 70 kb umfassendes Virulenzplasmid pYV (plasmid of *Yersinia* *virulence*), auf dem wichtige Pathogenitätsdeterminanten kodiert sind, die für die Infektiosität und die Resistenz gegenüber der unspezifischen Immunantwort des Wirtes verantwortlich sind (Revell & Miller, 2001; Heesemann, 2006). Zu diesen gehören unter anderem die Yops (*Yersinia* outer membrane proteins), die es den Yersinien ermöglichen, die Phagozytose durch professionelle Phagozyten zu verhindern. Die Effektorproteine YopE, YopP (YopJ in *Y. pseudotuberculosis*), YopT, YopH, YopO (YpkA in *Y. pseudotuberculosis*) und YopM werden bei Zellkontakt in Makrophagen und polymorphkernige Neutrophile (PMNs) injiziert. YopE, YopH, YopT und YopO wirken der Phagozytose entgegen, indem sie Signaltransduktionswege beeinflussen, die für die Aktinumlagerungen im Zytoskelett wichtig sind (Grosdent *et al.*, 2002; Thiefes *et al.*, 2006). So wirkt beispielsweise YopH als Tyrosin-Phosphatase und dephosphoryliert die Fokale Adhäsions Kinase (FAK), Paxillin sowie die Tyrosinkinase p130^{CAS} (Bleves & Cornelis, 2000). Dadurch wird der Kontakt zwischen den extrazellulären Matrixproteinen und dem intrazellulären Zytoskelett negativ beeinflusst und eine phagozytotische Aufnahme des Bakteriums verhindert (Adkins *et al.*, 2007). YopP verhindert die Antigenpräsentation auf Makrophagen und ist darüber hinaus für die Apoptose in Makrophagen verantwortlich (Ruckdeschel *et al.*, 2001; Zauberman *et al.*, 2006), während YopM vermutlich natürliche Killerzellen unterdrückt (siehe Abbildung 1.6) (Kerschen *et al.*, 2004).

Die Translokation der Yops erfolgt durch ein Typ III-Sekretionssystem (Injektisom), das aus 29 Ysc-Proteinen (*Y*op *s*ecretion) besteht (Cornelis, 2002; Viboud & Bliska, 2005; Heesemann *et al.*, 2006). Bisher gibt es nur erste Hinweise auf die Erkennungssignale, die die Yops als Substrate für die Typ III-Sekretionsmaschinerie kennzeichnen. Es wird vermutet, dass die *yop* mRNAs oder spezifische tRNAs daran beteiligt sein könnten (Ramamurthi & Schneewind, 2003).

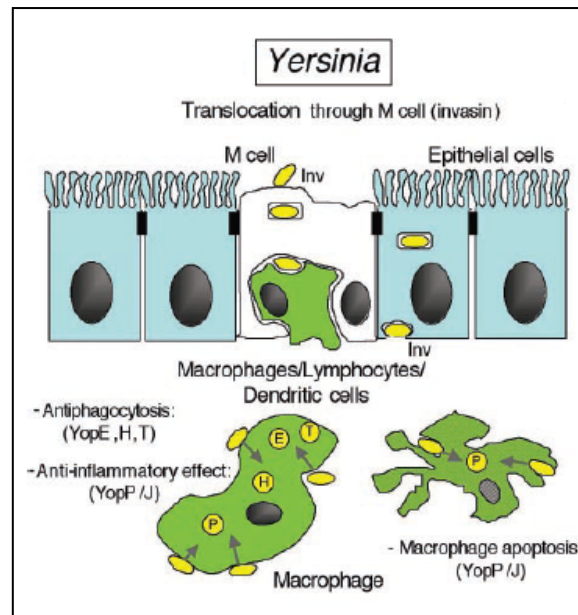


Abb. 1.6: Invasions- und Überlebensstrategie enteropathogener Yersinien. Nach der Translokation der Bakterien durch die M-Zellen gewährleisten die antiphagozytären, antiinflammatorischen sowie die Apoptose induzierenden Effekte der Yop-Proteine die Resistenz gegenüber Makrophagen (Cossart & Sansonetti, 2004).

Die Expression der Yops wird bei 37°C durch den ebenfalls in die YadA-Expression involvierten Transkriptionsaktivator VirF (siehe Kapitel 1.3.4.3) induziert, kann aber temperaturunabhängig auch durch Zellkontakt stimuliert werden (Lambert de Rouvroit *et al.*, 1992; Pettersson *et al.*, 1996). Sowohl die Yop- als auch die Ysc-Proteine gehören darüber hinaus zu dem „low calcium response stimulon“ (LCRS). Dieser Name begründet sich darin, dass die Transkription der hier lokalisierten Gene bei 37°C bei millimolaren Kaliumkonzentrationen reprimiert ist (Straley *et al.*, 1993; Wattiau *et al.*, 1994).

1.5 Determinanten der eukaryotischen Wirtszelle für den bakteriellen Adhäsions- und Invasionsprozess

Während die Aufnahme durch Phagozyten einen für die Bakterien passiven Vorgang darstellt, ist die bakterielle Invasion in normalerweise nicht-phagozytierende Zellen ein aktiver Prozess, der auf der Interaktion bakterieller und zellulärer Determinanten basiert. Bei dem in Kapitel 1.3 beschriebenen, von Yersinien zur Internalisation verwendeten „Zipper“-Mechanismus werden Zelladhäsionsmoleküle direkt oder indirekt über eine Brücke aus extrazellulären Matrixproteinen gebunden. Diese Determinanten der Wirtszelle werden im Folgenden beschrieben.

1.5.1 Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle verbinden Zellen zu multizellulären Komplexen und Geweben und stellen ein Instrument zur Kommunikation dar. Somit haben sie Bedeutung für die Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose von Zellen. Zelladhäsionsmoleküle können in vier Gruppen unterteilt werden: Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie, Selektine, Cadherine und Integrine. Eine Vielzahl dieser Moleküle wird von bakteriellen und viralen Pathogenen genutzt, um den Kontakt an die eukaryotische Wirtszelle herzustellen (Hauck, 2002; van der Flier & Sonnenberg, 2001; Boyle & Finlay, 2003). Enteropathogene Yersinien besitzen die Fähigkeit, direkt und indirekt an β_1 -Integrine zu binden (Isberg & Leong, 1990; Eitel & Dersch, 2002). Bei ihnen handelt es sich um transmembrane Rezeptorproteine, die Proteine der extrazellulären Matrix binden und membrangebundene Rezeptoren auf anderen Zellen erkennen können. Als Heterodimere bestehen sie aus je einer α - und einer β -Untereinheit, die beide eine große extrazelluläre Domäne, eine einfache transmembrane Domäne und eine kurze zytoplasmatische Region besitzen (siehe Abbildung 1.7). In Säugetieren sind bisher 19 verschiedene α - und 8 verschiedene β -Untereinheiten identifiziert worden. Diese bilden 25 verschiedene Integrine, die je nach Kombination der Untereinheiten spezifisch an einen oder mehrere Liganden binden. Integrine der Subfamilie β_1 erkennen Proteine der extrazellulären Matrix wie Fibronektin, Kollagen und Laminin (Bosman & Stamenkovic, 2003). Die Ligandenbindestelle liegt innerhalb der von beiden Untereinheiten gebildeten Köpfchendomäne (Humphries *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2002). Die Interaktion von Ligand und Integrin kann unter anderem von der Konformation des Liganden oder von kurzen Erkennungssequenzen innerhalb des Liganden, wie der Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) im Fall des extrazellulären Matrixproteins Fibronektin abhängig sein (Giancotti & Ruoslahti, 1999; Leahy *et al.*, 1996).

Namensgebend für die Integrine ist ihre integrative Fähigkeit, das „Zelläußere“ mit dem „Zellinneren“ zu verknüpfen und Signale bidirektional weiterzuleiten. Aufgrund der Bindung an Moleküle der extrazellulären Matrix können Integrine ihre Konformation ändern, woraufhin ihre zytoplasmatischen Domänen über „linker“-Moleküle mit dem Aktinzytoskelett und weiteren Signalmolekülen interagieren, die ihrerseits verschiedene Signalwege initiieren können (outside-

inside-signalling). Darüber hinaus können Integrine auch auf intrazelluläre Signale mit einer Konformationsänderung reagieren und so aus einem inaktiven Zustand in einen aktiven Zustand versetzt werden (inside-outside-signalling) (Ginsberg *et al.*, 1992; Hughes *et al.*, 1998; Hynes, 2002).

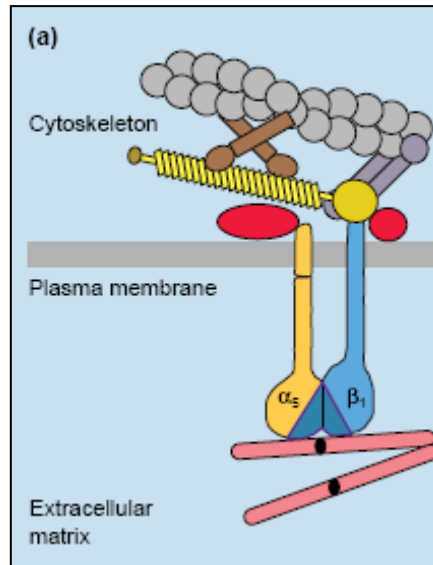


Abb. 1.7: Integrin mit intra- und extrazellulären Verknüpfungen. Schematische Darstellung eines α₅β₁-Integrins, das an das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin (rosa) gebunden hat und intrazellulär mit verschiedenen Signalmolekülen assoziiert ist (verändert nach Hynes, 1999).

Bei der Aktivierung durch intrazelluläre Proteine konnte das Aktin-bindende Talin als ein beteiligter Hauptfaktor identifiziert werden (Tadokoro *et al.*, 2003). In adhären Zellen sind Integrine an Zellanheftungspunkten, den so genannten „focal adhesions“ geclustert. Charakteristisch hierfür sind die Zellform bestimmenden, dicht gebündelten Aktinfasern und eine Ansammlung von intrazellulären Signalmolekülen, unter denen die Fokale Adhäsions Kinase (FAK) die prominenteste ist (Hauck, 2002). Alrutz & Isberg (1998) konnten die Beteiligung der FAK an dem Invasin-vermittelten Invasionsprozess nachweisen. FAK ist ein 125 kDa großes Protein, das eine N-terminale Autophosphorylierungsstelle (Y397), eine zentrale Kinase-Domäne und eine C-terminale FAT-Region („fokal adhesion targeting“) besitzt, die für die Lokalisation des Proteins in den fokalen Adhäsionen verantwortlich ist (Schaller *et al.*, 1994; Illic *et al.*, 1995, 1997). Der Autophosphorylierungsregion Y397 kommt bei der Invasin-vermittelten Aufnahme eine entscheidende Funktion zu. Wird FAK an der Position Y397 Tyrosinphosphoryliert, so bildet sich dort eine Bindestelle für die SH2-Domäne der Src-Kinase, welche durch die Bindung mit FAK selbst aktiviert wird (Schläpfer & Hunter, 1997; Alrutz & Isberg, 1998). Dies resultiert in der Phosphorylierung von

weiteren Zellsignal-Komponenten, wie Paxillin und pCas¹³⁰, die in Zusammenhang mit dem Rearrangement von Aktinfilamenten stehen (Alrutz & Isberg, 1998; Isberg *et al.*, 2000).

1.5.2 Die extrazelluläre Matrix (EZM)

Die extrazelluläre Matrix stellt die Gesamtheit der Makromoleküle dar, die sich außerhalb der Plasmamembran von Geweben befindet und kommt in allen vier Grundgewebetypen, wie Epithelzellen, Muskel-, Nerven- und Bindegewebe vor. Sie gewährleistet hauptsächlich die Formgebung sowie den mechanischen Halt zwischen den unterschiedlichen Zellen im Gewebe und koordiniert Migration, Adhäsion und Invasion von Zellen während der Embryogenese und der Wundheilung, ist für die Ausbildung der Zellpolarität maßgeblich und überträgt Signale aus der Umwelt in die Zelle. Daher ist sie mitverantwortlich für die Proliferation, die Differenzierung und den Zelltod (Zamir *et al.*, 2000). Das komplexe Netzwerk der von der Zelle sezernierten EZM-Komponenten variiert in der Komposition und Organisation abhängig von den Erfordernissen und der Funktion eines Gewebes. So verleiht die EZM Knochen, Bändern und Zähnen ihre starke Zugfestigkeit und ermöglicht die Abfederung von Kräften, die auf die Gelenke einwirken. Komponenten der EZM sind zum einen die aus Polysaccharidketten aufgebauten Glycosaminoglykane und Proteoglykane und zum anderen fibrilläre Proteine wie Kollagen, Laminin und Fibronectin (siehe Abbildung 1.8) (Löffler *et al.*, 2007).

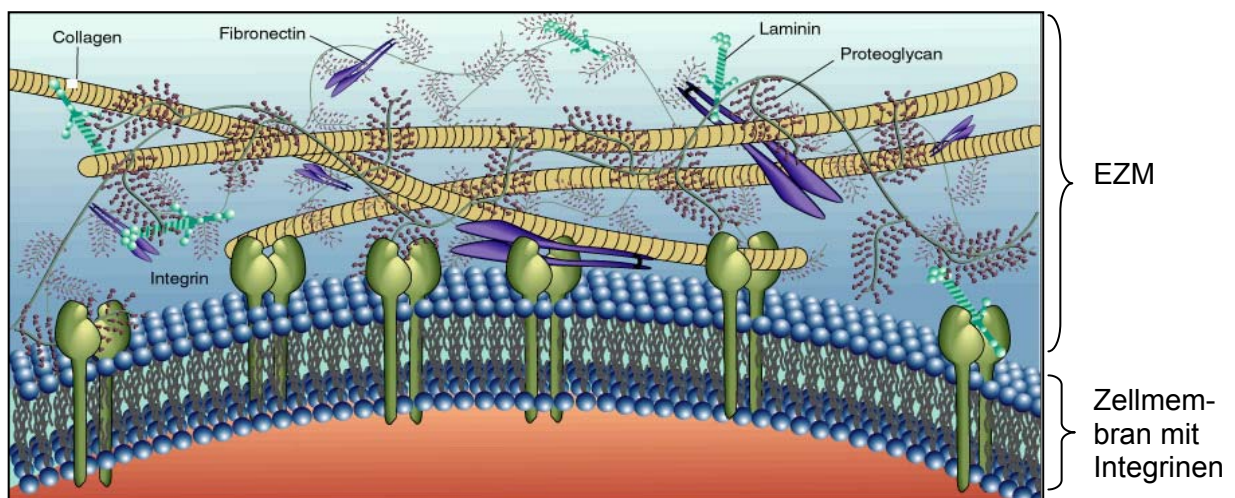


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der extrazellulären Matrix und transmembranen Integrine einer eukaryotischen Zelle.

Verschiedene Bakterien können an diese Moleküle binden und dadurch den ersten Kontakt zur Wirtszelle herstellen (Patti *et al.*, 1994; Pizarro-Cerda & Cossart, 2006). Die Klasse der bakteriellen Adhäsine, die an EZM-Moleküle binden, werden als MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) zusammengefasst (Joh *et al.*, 1999).

Fibronectin ist ein multifunktionelles Glykoprotein, das in löslicher Form im Blut, in extrazellulären Flüssigkeiten und in seiner zellulären Form auch auf der Oberfläche von Zellen und im Bindegewebe vorkommt. Neben seiner Funktion für die Blutgerinnung spielt es eine wichtige Rolle bei der Zellmigration, Gewebeintegrität und als Adhäsionsprotein. Es wird aus zwei großen Untereinheiten gebildet, die durch zwei Disulfidbrücken in der Nähe der Carboxyenden verbunden sind. Um seine Vielzahl von Funktionen zu erfüllen, enthält Fibronectin Bindungsregionen für Fibrin, Heparin und Kollagen sowie eine Zellbindungsdomäne (siehe Abbildung 1.9 A). In dieser ist die zellbindende Aktivität in einer spezifischen Tripeptid-Sequenz (Arg-Gly-Asp - RGD) lokalisiert, die für die Bindung des Fibronectins an Integrine essentiell ist. Insgesamt binden über 16 bakterielle Spezies an Fibronectin, darunter gramnegative Bakterien wie Yersinien, Neisserien und *E. coli* und die grampositiven Staphylokokken und Streptokokken (Tertti *et al.*, 1992; Preissner & Chhatwal, 1999; Virkola *et al.*, 2000; Schwarz-Linek *et al.*, 2006). Die Bindestelle für grampositive Kokken im Fibronectin konnte innerhalb des 30 kDa N-terminalen Fragments lokalisiert werden (Mosher & Proctor, 1980; Joh *et al.*, 1998; Talay *et al.*, 2000).

Die Kollagene sind die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix. Das charakteristische Merkmal eines Kollagenmoleküls ist die lange, steife, dreisträngige Helixstruktur. Diese Konformation ist durch monoton wiederholte Triplet Sequenzen aus Gly-X-Y bedingt, wobei X und Y häufig Prolin und Hydroxyprolin sind. Drei Kollagen-Polypeptidketten, die so genannten α -Ketten, sind in Form einer seilartigen Superhelix umeinander gewunden (siehe Abbildung 1.9 B). Je nach Kombination der unterschiedlichen einzelnen Polypeptidketten werden 27 verschiedene Kollagentypen gebildet (Eyre, 2004). Klebsiellen, *E. coli*, Streptokokken und Staphylokokken sind einige der Bakterien, die an die verschiedenen Kollagentypen binden können (Patti *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu Fibronectin und Laminin besitzt das Kollagen entlang der dreisträngigen Helix mehrere Bindestellen für Bakterien (Preissner & Chhatwal, 1999). Während

beispielsweise sowohl das Ace-Protein aus *Enterococcus faecalis* als auch das Cna-Protein aus *Staphylococcus aureus* an mehrere Stellen im Kollagen Typ I bindet (Rich *et al.*, 1999b; Rich *et al.*, 1999a), konnte für das Dr Adhäsion von diffus adhärierenden *E. coli*-Stämmen gezeigt werden konnte, dass es die 7S Domäne des Kollagens Typ IV bindet (Servin, 2005).

Laminin stellt eine der Hauptkomponenten der Basalmembran dar (Paez *et al.*, 2007). Es besteht aus drei Polypeptidketten (α , β und γ), die ein kreuzförmiges Glykoprotein bilden (siehe Abbildung 1.9 C). In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Moleküls aus den verschiedenen fünf α -, drei β - und drei γ -Ketten existieren 15 Isoformen (Nguyen & Senior, 2006). Laminin zeichnet sich durch eine Vielzahl separater Bindungsdomänen für beispielsweise Kollagen Typ IV und Heparin aus und kann an verschiedene Rezeptoren der eukaryotischen Zelle wie Syndecane und Integrine binden (Suzuki *et al.*, 2005). *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Helicobacter pylori* gehören zu den Mikroorganismen, für die eine Bindungsfähigkeit an Laminin nachgewiesen werden konnte (Kukkonen *et al.*, 1993; Preissner & Chhatwal, 1999).

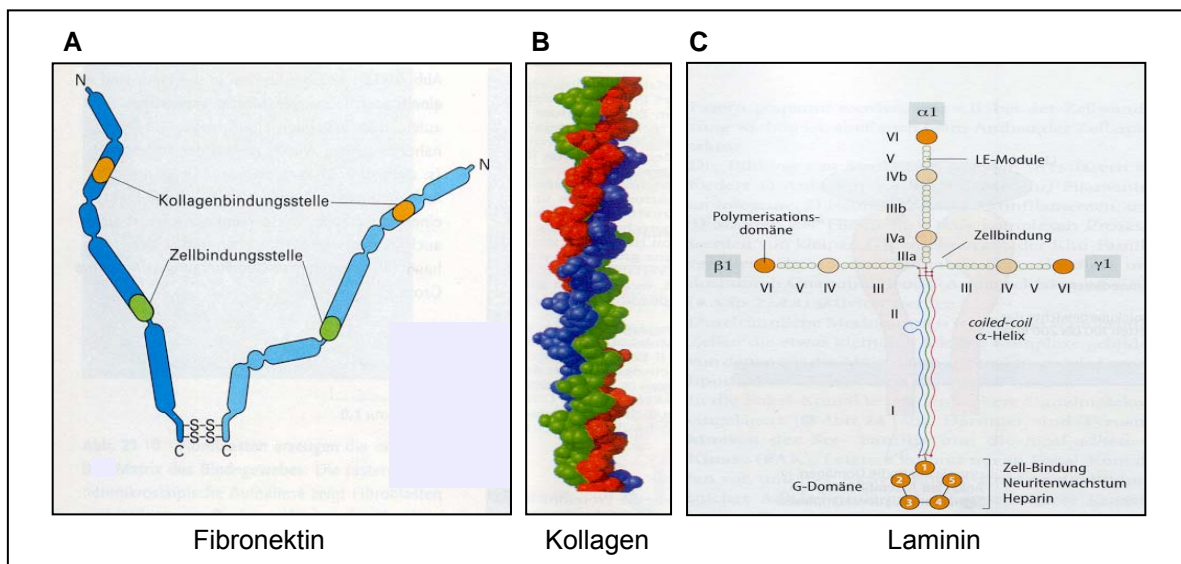


Abb. 1.9: Schematische Darstellung verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix. (A) Fibronectin, (B) Kollagen und (C) Laminin (nach Alberts *et al.*, 2005; Löffler *et al.*, 2007). Weitere Erläuterungen im Text.

2. Zielsetzung

Das multifunktionelle, afimbriäre Adhäsın YadA der enteropathogenen Bakterien *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* vermittelt durch die Bindung an Moleküle der extrazellulären Matrix Adhärenz an Säugetierzellen. Für YadA aus *Y. pseudotuberculosis* konnte neben der Fähigkeit zur Adhäsion auch die Fähigkeit nachgewiesen werden, effizient in eukaryotische Zellen einzuwandern. Während durch vorhergehende Untersuchungen der Mechanismus der YadA_{pstb}-vermittelten Invasion bereits weitgehend aufgeklärt werden konnte, ist bislang jedoch unbekannt, warum keine Internalisierung der Bakterien durch YadA aus *Y. enterocolitica* vermittelt wird.

Ziel dieser Arbeit war es, sowohl bakterielle als auch wirtszellspezifische Determinanten zu identifizieren, die für die YadA-vermittelte Invasion von Bedeutung sind. Die YadA-Proteine aus *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* sollten bezüglich ihrer Struktur von möglicherweise invasionsrelevanten Domänen verglichen und die Bedeutung dieser Regionen für die Invasion und weitere YadA spezifische Virulenzeigenschaften sowie die Pathogenese charakterisiert werden. Untersuchungen der an der YadA-vermittelten Invasion beteiligten Determinanten der Wirtszelle sollten dazu beitragen, den mechanistischen Unterschied zwischen Adhäsion und Invasion aufzuklären.

Neben der Identifizierung der für die Invasion essentiellen bakteriellen und wirtszellspezifischen Determinanten ist von besonderem Interesse, worin sich die Signaltransduktionsvorgänge der eukaryotischen Zelle bei der Adhäsion und Invasion unterscheiden. Um diesbezügliche Analysen zu vereinfachen und unabhängig von anderen bakteriellen Faktoren und von dem bakteriellen Expressionsmuster durchführen zu können, sollte untersucht werden, inwiefern lösliche YadA-Proteinderivate geeignet sind, sowohl die Bindung und Einwanderung in eukaryotische Zellen als auch die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden in der Wirtszelle zu vermitteln.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen AppliChem, Bioline, Fermentas, Millipore, Neolab, PerkinElmer, Promega, Qiagen, Roche, Roth, Schleicher & Schuell, Sigma und VWR bezogen. Polymerasen, Restriktionsenzyme und andere modifizierende Enzyme stammten aus dem Angebot der Firmen New England Biolabs, Promega, Qiagen und Roche. Die benutzten DNA- und Proteingrößenstandards waren aus dem Sortiment der Firma Fermentas.

3.1.1 Bakterienstämme, Medien und Kulturbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* und *Y. pseudotuberculosis* Stämme (siehe Tabelle 3.1) wurden bei 25°C oder 37°C in oder auf LB Medium (Luria-Bertani) angezogen (Sambrook *et al.*, 1989). Antibiotika wurden in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 30 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml und Gentamycin 50 µg/ml. Sollte YadA unter der Kontrolle des pBAD-Promotors exprimiert werden, wurde den Flüssigkulturen 0,2-2 % steriltfiltrierte Arabinose hinzugefügt. Kulturen zur Herstellung elektrokompeter Zellen und zur phänotypischen Expression nach einer Elektroporation wurden in DYT Medium (Double Yeast Tryptone Medium) angezogen (Miller, 1992).

Tabelle 3.1: Bakterienstämme

Stamm	Merkmale	Referenz
CC118λpir	F ⁻ Δ(<i>ara-leu</i>)7697 Δ(<i>lacZ</i>)74 Δ(<i>phoA</i>)20 <i>araD139 galE galK thi rpsE rpoB arfE^{am} recA1</i> , λpir	Manoil & Beckwith, 1986
S17-1λpir	<i>recA thi pro hsdR⁻ M1⁺</i> (RP4-2 Tc::Mu-Km::Tn7), λpir	Simon <i>et al.</i> , 1983
BL21λDE3	F ⁻ , <i>gal met r⁻ m⁻ hdsS λ_{lys}placUV5-T7-Gen1, plac^f lac</i>	Studier & Moffat, 1986
YPIII	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> Wildtyp, Serogruppe III, pIB1	Bolin <i>et al.</i> , 1982
YP31	pIB1 ⁻ , <i>inv::Tn10</i>	Eitel & Dersch, 2002

YP45	pIB1, <i>yadA</i> ⁺	diese Arbeit
YP46	pIB1, <i>yadA</i> Δ53-83	diese Arbeit
YP47	pIB1, <i>yadA</i> ::Kan	diese Arbeit

3.1.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Zu den Plasmiden, die in der vorliegenden Arbeit konstruiert wurden, sind ebenfalls die verwendeten Primer (siehe Tabelle 3.3) angegeben.

Tabelle 3.2: Plasmide

Plasmid	Merkmale	Referenz
pBAD18	Promotor des <i>araBAD</i> -Operons, Amp ^R , ori pBR322	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pGP704	Ori R6K, suicide vector, Amp ^R	Miller & Mekalanos, 1988
pKOBEG- <i>sacB</i>	recombination vector, <i>sacB</i> ⁺ , Cm ^R	Derbise <i>et al.</i> , 2003
pET28a	T7 overexpression vector, 6xHis-tag, Kan ^R	Novagen
pJE13	pBAD18, <i>yadA_{ent}</i> ⁺ , Amp ^R	Eitel & Dersch, 2004
pPD284	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ , Amp ^R	Eitel & Dersch, 2002
pTH1	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ Δ53-83, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 170, 171	diese Arbeit
pTH2	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ K59A, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 192, 193	diese Arbeit
pTH3	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ P70, 71A, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 194, 195	diese Arbeit
pTH4	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ K79A, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 196, 197	diese Arbeit
pTH6	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ A58E, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 205, 206	diese Arbeit
pTH7	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ P60A, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 207, 208	diese Arbeit
pTH8	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ E65A, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 209, 210	diese Arbeit
pTH9	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ V190D, A191D, I192E, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 232, 233	diese Arbeit
pTH10	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ V220D, S221D, I222E, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 234, 235	diese Arbeit
pTH11	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ Δ53-83 V190D, A191D, I192E, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 232, 233	diese Arbeit
pTH12	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ Δ53-83 V220D, S221D, I222E, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 234, 235	diese Arbeit
pTH13	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ H194A, H197A, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 244, 245	diese Arbeit

pTH14	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ Δ53-83 H194A, H197A, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 244, 245	diese Arbeit
pTH20	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ Δ53-83 Δ118-139, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 341, 342	diese Arbeit
pTH21	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ Δ118-139, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 341, 342	diese Arbeit
pTH22	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ Δ53-67, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 433, 434	diese Arbeit
pTH24	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ Δ68-83, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 435, 436	diese Arbeit
pTH25	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ V133D, N134A, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 431, 432	diese Arbeit
pTH26	pBAD18, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ Δ53-83 V133D, N134A, Amp ^R , Pr.: 169, 172, 604, 605	diese Arbeit
pTH27	pGP704, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ , Pr.: 396, 397	diese Arbeit
pTH28	pGP704, <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ Δ53-83, Pr.: 396, 397	diese Arbeit
pTH37	pET28a, aa26-253 <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ , 6xHis-tag N-terminal, Pr.: I58, I219	diese Arbeit
pTH38	pET28a, aa26-222 <i>yadA_{pstb}</i> ⁺ Δ53-83, 6xHis-tag N-terminal, Pr.: I58, I219	diese Arbeit

3.1.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen und sind in der Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3: Oligonukleotide. Unterstrichene Bereiche kennzeichnen Restriktions-schnittstellen, fettgedruckte Bereiche einzuführende Basensubstitutionen.

Bezeichnung	Sequenz	Restriktions-schnittstelle
Primer 169	5'-GCGGCGGGT <u>ACCG</u> GATTATACAAAACATCCGGTTT GAGGTGAGG-3'	<i>KpnI</i>
Primer 170	5'-GCCTAGTACTTGTGGTTGTATTGCTTCTGCTAAACC CAATTTAGGATCAACATTTGGGCTTATTTGAAC-3'	keine
Primer 171	5'-GTTCAAATAAGCCCAAATGTTGATCCTAAATTGGGT TTAGCAGAAGCAATACAACCACAAGTACTAGGC-3'	keine
Primer 172	5'-ACGCCTCAGCTGATTTTTTATTTGCATGTTCTTCAG C-3'	<i>PvuII</i>
Primer 192	5'-GGATTATATCCAGCAG C ACCAATATTAC-3'	keine
Primer 193	5'-GTAATATTGGT GCT GCTGG ATATAATC-3'	keine
Primer 194	5'-CCAAAATTAGCT G CACGAGGTCC-3'	keine
Primer 195	5'-GGACCTCGTG CAGC TAATTTTGG-3'	keine
Primer 196	5'-GGTCCAGAA G CAAAAAGAGCT-3'	keine
Primer 197	5'-GCTCTTTT GCT TCTGGACC-3'	keine
Primer 205	5'-GGATTATATCCAG A AAAACCAATATTAC-3'	keine
Primer 206	5'-GTAATATTGGTTTT TCT GGATATAATCC-3'	keine

Primer 207	5'-CCAGCAAAAG G CAATATTACGTCAAG-3'	keine
Primer 208	5'-CTTGACGTAATATTG C TTTTGCTGG-3'	keine
Primer 209	5'-CAATATTACGTCAAG C AAACCCAAAATTAC-3'	keine
Primer 210	5'-GTAA TTTTGGGTTT G CTTGACGTAATATTG-3'	keine
Primer 232	5'-CAAACTCTGAT GACGAG GGACACTCTAGTC-3'	keine
Primer 233	5'-GACTAGAGTGTCC CTCGT CATCAGAGTTTTG-3'	keine
Primer 234	5'-GAGAATAGTGAT GACGAG GGTCATGAAAGC-3'	keine
Primer 235	5'-GCTTTCATGACC CTCGT CACTACTATTCTC-3'	keine
Primer 244	5'-GCCATTGGAG GC CTCTAGT GCC GTTGCGGCAG-3'	keine
Primer 245	5'-CTGCCGCAACG GC ACTAGAG GCT CCAATGGC-3'	keine
Primer 341	5'-CATTGCGATTGGTGCTACTGCTGAAGCAGCACCTTT AAGTAAGGCATTGGGAGATTCGGC-3'	keine
Primer 342	5'-GCCGAATCTCCCAATGCCTTACTTAAAGGTGCTGCT TCAGCAGTAGCACCAATCGCAATGC-3'	keine
Primer 396	5'-GCGGCG GAATTCT GCGGAGTGGATAAATCGG-3'	<i>EcoRI</i>
Primer 397	5'-CTCAGTTATAACATCTGAG-3'	keine
Primer 433	5'-GCCCCAAATGTTGATCCTAAATTGGGTAAATTACCTC CA CGAGGTCCACAAGG-3'	keine
Primer 434	5'-CCTTGTGGACCTCGTGGAGGTAATTTACCCAATTTA GG ATCAACATTTGGGC-3'	keine
Primer 435	5'-CCAATATTACGTCAAGAAAACCCATTAGCAGAAGCA AT ACAACCACAAG-3'	keine
Primer 436	5'- CTTGTGGTTGTATTGCTTCTGCTAATGGGTTTTCTTGA CGTAATATTGG-3'	keine
Primer 604	5'-GGTTCAATTGCAACAGGCGAT GCT TCTGTTGCAATT GG-3'	keine
Primer 605	5'-CCAATTGCAACAGAAG GC ATCGCCTGTTGCAATTGA CC-3'	keine
Primer 850	5'- GCAAAGCAAAAGTTCAAAATC ACCAAGCACCTTTT ATATTTCTTTAATTTCCCGTGAATAAAAGCTCAGTTATA AC-3'	keine
Primer 851	5'- GGTTAATTGGTTGTAAC ACT GGC ATTTAGAAATTAA CAAGTCTATAGGAAAACACCGATTACATAATCGTAATC GG-3'	keine
Primer 852	5'-CCCAGCCAATTGCGTAAATGG-3'	keine
Primer 854	5'-GAAAATAAGTGTGTTGTCAGG-3'	keine
Primer I58	5'-GCGGCG GCTAGCG AGGAGCCCGAGGATGCG-3'	<i>NheI</i>
Primer I219	5'-GCGGCG CTCGAG TTACATTTCTTTCTTTAATTGCGC G-3'	<i>XhoI</i>

3.1.4 Humane Zelllinie, Medien und Kulturbedingungen

Humane Epithelzellen des Larynxkarzinoms (HEp-2 Zellen) wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in RPMI1640 Medium (Biochrom) kultiviert. Das Medium wurde mit 5-10 % Kälberserum (Sigma) und 2 mM L-Glutamin (Biochrom) versetzt (Dulbecco & Freeman, 1959). Bei konfluentem Zellwachstum wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und 1:10 in frischem Medium verdünnt in neue Kulturgefäße umgesetzt. Produkte für Zellkulturarbeiten wurden von Biochrom, Sigma und GibcoBRL bezogen.

3.2 Molekularbiologische Standardmethoden

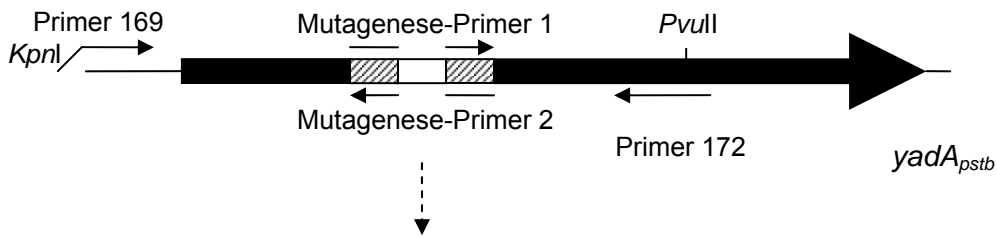
Alle Arbeiten mit DNA, Restriktionsverdau, PCRs, Ligationen und Transformationen wurden standardgemäß durchgeführt (Sambrook, 2001). Plasmid-DNA wurde mit Qiagen Kits präpariert und gereinigt. Als Polymerasen zur Amplifikation von DNA kamen die *Taq*-Polymerase (New England Biolabs), die *Phusion*-Polymerase (New England Biolabs), die ProofStart-Polymerase (Qiagen) und die *Pfu*-Polymerase (Promega) zum Einsatz.

3.2.1 Gerichtete Mutagenese

Die Einführung von Deletionen, Insertionen oder Substitutionen spezifischer Nukleinsäuren innerhalb des *yadA_{pstb}*-Gens erfolgte durch eine so genannte 2-Schritt PCR. Dabei werden zwei interne Mutagenese-Primer und zwei externe Primer, die jeweils eine Restriktionsschnittstelle beinhalten, verwendet.

Im ersten Schritt wurden mit je einem externen und einem internen Primer überlappende, die einzuführende Mutation tragende PCR-Produkte synthetisiert. Im zweiten Schritt synthetisierten die externen Primer (Nr. 169 und 172, siehe Tabelle 3.3) aus beiden Teilfragmenten das die Mutation beinhaltende PCR-Endprodukt (siehe Abbildung 3.1). Dieses wurde in die *KpnI/PvuII* Restriktionsschnittstelle des Vektors pPD284 (*yadA*⁺) kloniert, aus der das *yadA_{pstb}*-Wildtypfragment zuvor ausgeschnitten worden war. Die Klonierungen wurde mittels Sequenzierung der Firma AGOWA überprüft. Die Expression der Gene konnte in dem pBAD18-basierten Vektor pPD284 durch die Zugabe von 0,2-2 % Arabinose induziert werden.

Schritt 1 (Primer 169 und Mutagenese-Primer 2, Primer 172 und Mutagenese-Primer 1)



Schritt 2 (Primer 169 und 172)

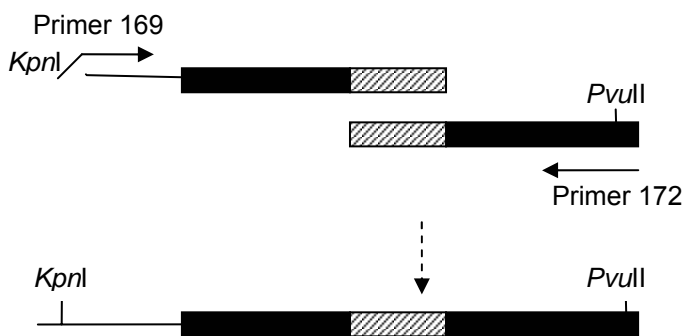


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der gerichteten Mutagenese durch 2-Schritt-PCR. Beispiel zur Einführung einer Deletion mit Hilfe von Mutagenese-Primern, die den zu deletierenden Bereich überspannen.

3.2.2 Konstruktion der *Y. pseudotuberculosis* *yadA*-Knockout-Mutante und Konstruktion weiterer *yadA*-Mutantenstämme

Die Konstruktion der *yadA*-Knockout-Mutante erfolgte mit Hilfe des RED Recombinase Systems (Derbise *et al.*, 2003) durch die Integration einer Kanamycinkassette in den *yadA* locus. Hierfür wurde mit den Primern Nr. 850 und 854 sowie Nr. 851 und 852 (siehe Tabelle 3.3) ein ca. 2000 bp umfassendes *yadA*::Kan PCR-Fragment generiert, das aus dem für die Kanamycinresistenz kodierenden Gen und jeweils ca. 500bp nichtkodierender *yadA*-upstream bzw. -downstream Sequenz am 5'- und 3'- Ende bestand. Dieses PCR-Produkt wurde in *Y. pseudotuberculosis* YPIII pKOBEG-*sacB* transformiert. Durch RED vermittelte Rekombination des *yadA*::Kan PCR-Fragments in das virulenz-plasmidkodierte *yadA*-Gen entstand eine *yadA*-Knockout-Mutante. Die Selektion dieses Ereignisses erfolgte durch Ausplattieren auf kanamycinhaltigen LB-Platten. Im Anschluss daran wurden die Bakterien auf LB-Platten ohne Natriumchlorid mit

10 % Sucrose kultiviert, um so die schnell wachsenden Kolonien, die das pKOBEG-*sacB* Plasmid verloren hatten, auszuwählen. Das Vorhandensein des *yadA*-Knockouts wurde mittels PCR und Sequenzierung überprüft.

Die *yadA*-Knockout-Mutante YP47 wurde dazu genutzt, die Bakterienstämme YP45 und YP46 zu erzeugen. Hierfür wurde das *yadA_{pstb}*-Gen und das *yadA_{pstb}Δ53-83*-Gen in den mobilisierbaren suicide Vektor pGP704 kloniert (*EcoRI/XbaI*) und mittels des zur Konjugation befähigten *E.coli* Stammes S17-1λpir in den Stamm YP47 übertragen. Transkonjuganten, die das *yadA_{pstb}Δ53-83*-Gen (YP46) bzw. das Wildtyp *yadA_{pstb}*-Gen (YP45) in den *yadA*-locus integriert hatten, wurden aufgrund ihrer Fähigkeit, auf *Yersinia*-Selektivmedium (Oxoid) zu wachsen und ihrer Resistenz gegenüber Kanamycin identifiziert. Die Integration des *yadA_{pstb}*- bzw. *yadA_{pstb}Δ53-83*-Gens wurde mittels PCR, Sequenzierung und Kontrolle der Proteinexpression überprüft.

3.2.3 Konstruktion von *yadA*-Überexpressionsplasmiden

Um die YadA-Kopfdomäne für weiterführende Analysen in größeren Mengen überproduzieren und aufreinigen zu können, wurde der pET28a Vektor zur Konstruktion der *yadA*-Überexpressionsplasmide verwendet. Er besitzt einen starken T7-Promotor, der eine entsprechende Überexpression des Proteins ermöglicht, wenn das Plasmid in einen *E.coli* Stamm transformiert wird, der die T7-RNA-Polymerase synthetisiert. Für die Überexpression wurde der Stamm BL21λDE3 verwendet. Mittels PCR wurden die für die Kopfbereiche kodierenden Sequenzen des *yadA_{pstb}*- bzw. *yadA_{pstb}Δ53-83*-Gens mit den Primern Nr. I58 und I219 (siehe Tabelle 3.3) generiert und in die *NheI/XhoI* Schnittstelle des Vektors pET28a kloniert, so dass die Proteine am N-Terminus mit sechs Histidincodons fusioniert wurden. Der His-Tag ermöglicht eine Reinigung des Proteins über eine Ni-NTA-Affinitätschromatografie (siehe Kapitel 3.3.3).

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblotanalyse

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht es, Proteine in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts in einer Polyacrylamidgelmatrix aufzutrennen. Dies wird durch die Eigenschaften des Sodiumdodecylsulfats (SDS) erreicht. Das anionische Detergenz SDS bindet an Proteine und führt dabei sowohl zu deren Entfaltung als auch zu einer negativen Ladung der Proteine, so dass der Gellauf der Proteine nur von ihrem Molekulargewicht bestimmt wird.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Es kamen 10-15 %ige Polyacrylamid-Trenngele (pH 8,8) und 4 %ige Sammelgele (pH 6,8) zum Einsatz. Für Ganzzelleextrakte aus Bakterienkulturen wurde 1 ml durch Zentrifugation pelletiert, in 100 µl 1x SDS-Probenpuffer (4x SDS-Probenpuffer: 0,24 M Tris-HCl pH 6,8; 8 % SDS; 40 % Glycerin; 12 % DTT; 0,004 % Bromphenolblau) resuspendiert und mit 1 µl Benzonase (Merck) versetzt. 10–20 µl der Probe wurden für die Gelelektrophorese (Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris; 0,19 M Glycin; 0,1 % SDS) eingesetzt. Die Gele wurden im Anschluss entweder mit Coomassie Färbelösung (1,25 g Coomassie Brilliant G250; 225 ml Methanol; 50 ml Essigsäure; 225 ml Aqua dest.) für 1 h gefärbt und danach mit Entfärbelösung (30 % Methanol, 10 % Essigsäure) für 2 h entfärbt oder ungefärbt für eine Immunoblotanalyse (Western-Blot) verwendet.

Die Immunoblotanalyse wurde nach der Methode von Towbin *et al.* (1979) durchgeführt. Sie dient dem immunologischen Nachweis von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen. Zum Einsatz kam eine Immobilon-P Membran (PVDF 0,45 µm; Millipore). Dem Transfer der Proteine folgte eine einstündige Absättigung unspezifischer Bindungen durch Inkubation in TBSTM (20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % TWEEN-20; 5 % Magermilchpulver). Für den Nachweis des YadA-Proteins wurde ein polyklonaler Antikörper benutzt, der in TBSTM 1:1000 verdünnt wurde. Dieser war in einem Kaninchen generiert worden, so dass nach drei Waschschritten mit TBST der Antigen-Antikörper-Komplex mittels eines sekundären, alkalische Phosphatase konjugierten anti-Kaninchen-Antikörpers (Sigma, 1:8000 in TBSTM) detektiert werden konnte. Die Membran wurde jeweils 1 h mit den Antikörpern inkubiert. Den letzten beiden Wasch-

schritten mit TBST und AP-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl_2) für je 10 min schloss sich die Farbreaktion mit dem chromagenen Farbsubstrat (BCIP/NBT) in AP-Puffer an, die das zu detektierende Protein sichtbar machte. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von H_2O gestoppt.

3.3.2 Außenmembranpräparation

Für die Präparation der Außenmembran wurden 200 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 20 ml TEM Puffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA pH 7,8, 1 mM β -Mercaptoethanol) sorgfältig bei 4°C resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer French Press in drei Durchgängen bei 1000 psi aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch „low-speed“-Zentrifugation abgetrennt und die Membranen durch einstündige Zentrifugation bei 100.000 x g pelletiert. Das Membran-Pellet wurde in 20 ml SM Puffer (0,5 % Sarkosyl, 1 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer einstündiger Zentrifugationsschritt bei 100.000 x g. Das die Außenmembran enthaltende Pellet wurde in 200 μl SDS-Probenpuffer resuspendiert und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert.

3.3.3 Überexpression und Reinigung von YadA-Proteinderivaten unter nativen Bedingungen

Um größere Mengen von den gereinigten YadA-Proteinderivaten $\text{YadA}_{p_{stb}\Delta\text{aa}26-253}$ und $\text{YadA}_{p_{stb}\Delta 53-83 \text{ aa}26-253}$ zu erhalten, wurden die konstruierten Überexpressionplasmide pTH 37 bzw. pTH38 (siehe Kapitel 3.2.3) überexprimiert und nativ aufgereinigt. Dazu wurden Kulturen der beiden Überexpressionsstämme bei einer OD_{600} von 0,5–0,7 mit 2 mM IPTG induziert. Nach 2 h weiteren Wachstums bei 37°C wurden die Zellen pelletiert, in 2 bis 5 ml Lysispuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) pro Gramm Nassgewicht sorgfältig resuspendiert und mit Hilfe der French Press in drei Durchgängen bei je 1000 psi aufgeschlossen. Das Lysat wurde bei 25.000 x g 30 min bei 4°C zentrifugiert. Die Reinigung der YadA-6xHis-Proteine erfolgte mittels Affinitätschromatografie mit Ni-NTA Agarose (Qiagen). Das Lysat wurde im Verhältnis 1:5 mit 50 % Ni-NTA Agarose versetzt. Das Lysat-Agarose-Gemisch wurde nach einstündigem

Schwenken bei 4°C auf eine Econo-Säule (BioRad) gegeben. Die Säule wurde nach dem Durchfluss der Probe mit vier Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Säulenvolumen Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0). Die Elutionsfraktionen und Ganzzelleextrakte der Überexpressionskultur vor und nach Induktion wurden zur Kontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie Färbelösung sichtbar gemacht (siehe Kapitel 3.3.1).

Zur weiteren Verwendung wurden die YadA-Proteinderivate gegen 10 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl dialysiert (zweimal 2 h und über Nacht). Die Proteinkonzentration konnte mit Hilfe des Coomassie Protein Assay Reagent Kits (Pierce) photometrisch bei der OD₅₉₅ unter Anwendung einer Eichgerade bestimmt werden.

3.3.4 Analytische Größenausschlusschromatografie

Die Größenausschlusschromatografie wird für die Bestimmung des Molekulargewichts von gelösten Proteinen genutzt. Für dieses Verfahren muss die Porengröße des Chromatografiematerials so groß sein, dass der Analyt hindurchdiffundieren kann. Es basiert darauf, dass für große Moleküle nicht alle Poren zugänglich sind, so dass diese früher als kleine Moleküle eluiert werden, denen ein größerer Teil der Poren zugänglich ist.

Eine Superdex 200 HR 10/30 Säule wurde mit dem YadA-Dialysepuffer (10 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl) äquilibriert, mit Carbonicanhydrase (29 kDa) und BSA (66 kDa) kalibriert und anschließend wurden je 100 µl der gereinigten YadA-Proteinderivate (0,5 mg/ml) über die Säule gegeben. Die Säulenchromatografie wurde mit dem FPLC-System Äkta 100 Explorer durchgeführt. Das Elutionsprofil wurde mittels UV-Absorption gemessen und konnte durch das Unicorn 3.0 Programm visualisiert und analysiert werden.

3.3.5 YadA-Bindestudien an Proteine der extrazellulären Matrix

Um die Bindefähigkeit verschiedener YadA-Derivate an Moleküle der extrazellulären Matrix zu untersuchen, wurden Kollagen-, Laminin- und Fibronectinbindeassays durchgeführt. Dazu wurden 96-well Immuno-Maxisorp Platten (NUNC) mit 100 μ l 10 μ g/ml Kollagen Typ I, II oder Laminin (Sigma) in TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) bei 4°C über Nacht beschichtet. Nach Waschen mit TBS wurden für 1 h unspezifische Bindungen mit 2 % BSA (Sigma) in TBS abgesättigt. Übernachtskulturen YadA-exprimierender Bakterien wurden einmal in TBS gewaschen und in 2 % BSA in TBS so resuspendiert, dass die Konzentrationen der verschiedenen Bakterienstämme angeglichen wurden. Für 1 h wurden je 10^6 Bakterien in den mit extrazellulären Matrixproteinen beschichteten wells inkubiert. Im Anschluss wurden die adhärenenten Bakterien mit 4 % Paraformaldehyd für 20 min fixiert und mit 100 μ l Kristallviolett (Merck, Stammlösung: 1,5 g Kristallviolett in 100 ml EtOH, Färbelösung: 200 μ l Stammlösung in 10 ml H₂O) für 10 min gefärbt. Nach dreimaligem Waschen folgte die Detektion der gefärbten Bakterien mittels eines Mikroplatten-Lesegerätes (BioRad) bei einer OD von 450 nm.

Zur Analyse der Bindung an das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin wurden Deckgläschen in einer 24-well Platte mit 100 μ l zellulärem Fibronectin (10 μ g/ml, Sigma) in TBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach Absättigung unspezifischer Bindungen mit 2 % BSA in TBS für 1 h wurden 10^7 YadA-exprimierende Bakterien in 2 % BSA in TBS auf die Fibronectin-beschichteten Deckgläschen gegeben und für 1 h inkubiert. Nach 20minütiger Fixierung der gebundenen Bakterien mit 4 % Paraformaldehyd und anschließend dreimaligem Waschen wurden die Präparate umgedreht auf einen Tropfen Glycerin (80 %) auf einen Objektträger überführt und mit Nagellack versiegelt. Gebundene Bakterien konnten bei mikroskopischer Betrachtung gezählt werden. Es wurden jeweils 30 Ausschnitte von drei unabhängigen Präparaten ausgewertet.

Um die Bindung beschichteter Latexkugeln an die verschiedenen Proteine der extrazellulären Matrix zu untersuchen, wurden die Glasplättchen mit Kollagen oder Fibronectin über Nacht mit den EZM-Molekülen beschichtet. Die Vorgehensweise entsprach der bereits für die Assays mit YadA-exprimierenden Bakterien beschriebenen. Es wurden 10^5 - 10^7 Latexkugeln pro Assay eingesetzt.

3.3.6 Untersuchung der Serumresistenz

Zur Analyse der YadA-vermittelten Serumresistenz wurden Überlebensversuche in humanem Serum durchgeführt. Von einer Bakteriensuspension mit 300-600 YadA-exprimierenden Bakterien wurden 10 µl mit 5 %igem humanem Serum bei 37°C für 1 h inkubiert. Als Kontrollen wurde bei 56°C für 30 min inaktiviertes Serum bzw. MgCl₂ (5 mM) verwendet. Überlebende Bakterien wurden durch Ausplattieren auf LB-Platten und anschließendes Auszählen detektiert. Die Überlebensrate wurde relativ zu der Zahl überlebender Bakterien nach der Inkubation mit inaktiviertem Serum bzw. MgCl₂ berechnet.

3.3.7 Untersuchung der Autoagglutination

Autoagglutination kann beobachtet werden, wenn Übernachtskulturen YadA-exprimierender Bakterien bei Raumtemperatur ohne weiteres Schütteln inkubiert werden, miteinander aggregieren und sich am Boden des Kulturgefäßes absetzen. Das schnelle Aufklaren des Mediums und Agglutinieren sowie der während der Inkubation über Nacht gebildete Biofilm wurde mittels einer Digitalkamera dokumentiert. Zur Quantifizierung der Autoagglutination wurden YadA-exprimierende Übernachtskulturen so mit frischem Medium verdünnt, dass alle Kulturen eine OD₆₀₀ von 1 hatten und die Autoagglutination durch die Abnahme der OD₆₀₀ gemessen werden konnte.

3.3.8 Untersuchung der Hämagglutination

Die Analyse der Hämagglutination erfolgt durch Inkubation YadA-exprimierender Bakterien mit Erythrozyten. Bei Übernachtskulturen YadA-exprimierender Bakterien wurde die OD₆₀₀ auf einen Wert von 0,3 eingestellt. Von dieser Suspension und mehreren 1:2 Verdünnungen wurden 50 µl zusammen mit 50 µl 2 %iger Schafserythrozyten-Lösung (Oxoid) in die u-förmigen wells einer 96-well Polypropylene-Platte (Costar) gegeben. Nach kurzem Rotieren der Mikrotiterplatte für 0,5 min auf einem Schütteltisch wurde die Hämagglutination nach 15 min fotografisch festgehalten.

3.3.9 Beschichtung von Latexkugeln mit YadA-Proteinderivaten

Um die Bindeeigenschaften der YadA-Proteinderivate $\text{YadA}_{\text{pstb}aa26-253}$ und $\text{YadA}_{\text{pstb}\Delta 53-83 aa26-253}$ an Moleküle der extrazellulären Matrix und HEp-2 Zellen untersuchen zu können, wurden Latexkugeln mit diesen Proteinderivaten beschichtet. Für diesen Zweck wurden 10^9 Latexkugeln ($1\ \mu\text{m}$, Sigma) in Glaszentrifugenröhrchen mit 1 ml PBS gewaschen und resuspendiert. 20 μl dieser Latexkugeln wurden in 1 ml PBS gegeben, ein weiteres Mal durch fünfminütige Zentrifugation bei 12.000 upm gewaschen und in 1 ml Beschichtungspuffer (0,2 M NaHCO_3 , pH 8,6, 0,5 M NaCl) aufgenommen. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Latexkugeln in 100 μl des Beschichtungspuffers resuspendiert und gereinigtes, dialysiertes YadA-Proteinderivat in gewünschter Konzentration (0,1-1 mg/ml) hinzugefügt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde 500 μl Beschichtungspuffer zugesetzt, die Probe für 30 Sekunden einer Ultraschallbehandlung unterzogen, 500 μl 20 mg/ml BSA in Beschichtungspuffer hinzugefügt und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Latexkugeln mit 1 mg/ml BSA in PBS gewaschen und in 1 ml 0,2 mg/ml BSA in PBS resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Beschichtungseffizienz wurde durch Bestimmung der Proteinkonzentration vor und nach der Beschichtung ermittelt sowie die Beschichtung mittels Immunoblotanalyse überprüft.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Adhäsions- und Invasionsassay

Adhäsions- und Invasionsassays ermöglichen es, die Fähigkeit verschiedener Bakterienstämme, an eukaryotische Wirtszellen zu binden und in sie einzuwandern, zu quantifizieren. Dazu wurden 5×10^4 HEp-2 Zellen in eine 24-well Platte (Biochrom) ausgesät und über Nacht kultiviert, so dass sie zu 80 % konfluent den Boden des Kulturgefäßes bedeckten. Nach dreimaligem Waschen der HEp-2 Zellen mit PBS wurden sie vor Zugabe der Bakterien mit Bindepuffer inkubiert (RPMI1640, 20 mM HEPES pH 7,0, 0,4 % BSA). Übernachtskulturen der Bakterien wurden einmal mit PBS gewaschen, die OD_{600} bestimmt und so in PBS resuspendiert, dass sich eine Infektionsdosis von 100 Bakterien pro Zelle ergab. Die Lebendzellzahl der eingesetzten Bakteriensuspensionen wurde zusätzlich

durch Ausplattieren einiger 1:10 Verdünnungen (10^{-4} - 10^{-7}) ermittelt. Nachdem die Bakterien zu den HEP-2 Zellen gegeben wurden, erfolgte zur Bestimmung der Adhäsion eine einstündige Inkubation bei 20°C. Zur Bestimmung der Invasion wurden die Zellen für 1h bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit gentamycinhaltigem Bindepuffer (500 µg/ml), um extrazelluläre Bakterien abzutöten. Nach den Inkubationszeiten folgten 3-5 Waschschriffe mit PBS und die anschließende Zelllyse mit 200 µl 0,1 %igem Triton X 100. Die Zelllysate wurden in LB verdünnt und in geeigneten Verdünnungstufen (1:5, 1:25, 1:125, 1:625) ausplattiert und ausgezählt.

Bei Invasionsassays mit inhibierenden, gegen extrazelluläre Matrixproteine oder Integrine gerichteten Antikörpern wurden die Zellen für 30 min vor Zugabe der Bakterien mit in Bindepuffer verdünnten Antikörpern bei 20°C inkubiert. Folgende Antikörper wurden verwendet: anti-Fibronektin (Calbiochem und Sigma), anti-Kollagen Typ I, II und IV (Chemicon und Sigma), anti-Laminin (Chemicon), GRGDSP- und GRGESP Peptide (GibcoBRL), monoklonale Integrin-blockierende Antikörper gegen α_1 5E8D (Upstate), α_2 (Chemicon), α_3 P1B5 (Chemicon), α_4 P1H4 (Chemicon), α_5 BLIG2 (Hybridoma Bank, University of Iowa), $\alpha_5\beta_1$ (Chemicon), α_v M9 (Chemicon), β_1 4B7 (Calbiochem).

3.4.2 Invasionsassays mit beschichteten Latexkugeln

Die Anheftung oder Internalisierung von mit YadA-Proteinderivaten beschichteten Latexkugeln an bzw. in eukaryotische Wirtszellen wurde anhand von Adhäsions- bzw. Invasionsassays und mikroskopischen Präparaten im Phasenkontrast und bei Fluoreszenz (FITC-Filter) beurteilt.

5×10^4 HEP-2 Zellen wurden dazu in 24-well Platten auf Deckgläschen ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in Bindepuffer (RPMI 1640, 20 mM HEPES, pH 7,0, 0,4 % BSA) inkubiert, bevor 10^6 - 10^7 beschichtete Latexkugeln zu den Zellen gegeben wurden. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1000 upm folgte für 2 h eine Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂. Nach drei Waschschriffen mit PBS wurden die Zellen mit 2 % Paraformaldehyd 20 min fixiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen zum Absättigen unspezifischer Bindungen mit 2 % Ziegsenserum in PBS für eine 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 1 h mit anti-YadA-Antikörper in

2 % Ziegenserum in PBS (1:500) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte eine einstündige Inkubation mit einem FITC-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper in 2 % Ziegenserum in PBS (1:1000). Die Deckgläschen wurden nach dreimaligem Waschen umgedreht in 80 % Glycerin eingebettet und versiegelt. Die Quantifizierung adhärenter und internalisierter Latexkugeln erfolgte mittels eines Zeiss Axiovert II Mikroskops. Im Phasenkontrast sind sowohl die gebundenen als auch internalisierten Latexkugeln zu erkennen. Bei der Fluoreszenzansicht sind nur die adhärenenten Latexkugeln sichtbar, da nur diese von den sekundären Antikörpern detektiert werden können.

3.4.3 Herstellung von Ganzzelextrakten für die Immunoblotanalyse

Die Aktivierung verschiedener Signalmoleküle der eukaryotischen Zelle infolge der Infektion mit YadA-beschichteten Latexkugeln wurde durch die Detektion des Phosphorylierungsstatus der Signalmoleküle untersucht. HEp-2 Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert. Die Zellen wurden für ca. 20 h in serumfreiem RPMI Medium unter Hungerbedingungen inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden 10 µg/ml der gereinigten und dialysierten YadA-Proteinderivate YadA_{pstb}aa26-253 und YadA_{pstb}Δ53-83 aa26-253 dazugegeben und für 0, 5, 10, 15, 30, 45 und 60 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit 200 µl SDS Probenpuffer lysiert und mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Die Extrakte wurden für 5 min bei 95°C gekocht und für 5 min abzentrifugiert. 10-20 µl wurden durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im anschließenden Immunoblot analysiert. Primäre Antikörper, die gegen die phosphorylierte und zur Kontrolle gegen die unphosphorylierte Form der Signalmoleküle gerichtet waren, wurden von den Firmen New England Biolabs und Calbiochem bezogen. Beim sekundären Antikörper handelte es sich um ein Peroxidase-Konjugat (Sigma). Die Detektion der Proteine erfolgte mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion mit Hilfe des „Western Lightning Chemiluminescence Reagent“ (Perkin Elmer).

3.4.4 IL-8-ELISA

Zur Bestimmung der IL-8-Sekretion wurden in 24-well Platten ausgesäte HEp-2 Zellen einmal mit PBS gewaschen und in Bindepuffer (RPMI 1640, 20 mM HEPES, pH 7,0, 0,4 % BSA) inkubiert. Übernachtskulturen der zu testenden Bakterien wurden in PBS gewaschen und so resuspendiert, dass sich jeweils eine Infektionsdosis von 100 Bakterien pro Zelle ergab. Nach vierstündiger Infektion wurden die HEp-2 Zellen einmal mit PBS gewaschen und über Nacht in Bindepuffer mit Gentamicin (500 µg/ml) bei 37°C inkubiert. Sollte die IL-8-Sekretion durch die löslichen YadA-Proteinderivate YadA_{pstb}aa26-253 und YadA_{pstb}Δ53-83 aa26-253 untersucht werden, wurden die HEp-2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (10-500 µg/ml) der YadA-Proteinderivate für ca. 20 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Sowohl bei bakterieller Infektion als auch bei der Infektion mit den löslichen Proteinen wurden die Zellüberstände nach der Inkubationszeit abzentrifugiert und zur Bestimmung des IL-8-Gehalts 1:5 verdünnt in einem „Human IL-8-ELISA Kit“ der Firma Ray Biotech eingesetzt. Der ELISA wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt: 100 µl der Zellüberstände oder der IL-8-Standard-Verdünnungen wurde in die mit anti-IL-8-Antikörper beschichteten wells pipettiert und für 2,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 1 x Waschlösung wurden pro well 100 µl 1:80 verdünnter, 1 x biotinylierter anti-IL-8-Antikörper hinzugefügt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur und viermaliges Waschen. Im Anschluss wurden 100 µl 1:30.000 verdünntes Peroxidase-Streptavidin in die wells pipettiert und für 45 min inkubiert. Die Reaktion wurde nach fünfmaligem Waschen durch 100 µl TMB Substrat Reagenz entwickelt und nach 30 min durch Zugabe von 50 µl Stop-Lösung beendet. Die Intensität der Gelbfärbung wurde bei 450 nm mittels eines Mikroplatten-Lesegerätes (BioRad) quantifiziert. Rekombinantes IL-8 diente dabei als Standard.

3.5 Tierversuche

Um die Bedeutung verschiedener YadA-Proteine für den Infektionsverlauf *in vivo* bestimmen zu können, wurden Tierversuche durchgeführt. Weibliche 6-8 Wochen alte BALB/c Mäuse wurden mit Hilfe von Knopfkanülen mit 5×10^9 Bakterien infiziert. Die Bakteriensuspensionen enthielten zu gleichen Teilen die Stämme

Y. pseudotuberculosis YP45 ($yadA_{pstb}$) und YP46 ($yadA_{pstb}\Delta 53-83$) bzw. YP45 ($yadA_{pstb}$) und YP47 ($yadA_{pstb}^-$). Nach zwei Tagen Infektionsdauer wurden die Mäuse mit dem Narkotikum Isofuran getötet und die Leber, Niere, Milz, das Ileum und die mesenterialen Lymphknoten entnommen. Die Organe wurden in PBS homogenisiert, wobei das Ileum zuvor 30 min in PBS mit 100 µg/ml Gentamycin inkubiert und anschließend gut gewaschen wurde. Die Anzahl an Bakterien pro Gramm Organ wurde durch Ausplattieren und Auszählen von Verdünnungsstufen der Organhomogenisate auf *Yersinia*-Selektivmedium (Oxoid) ermittelt. Für die Selektion der Bakterien der *Y. pseudotuberculosis* Stämme YP46 und YP47 wurden geeignete Verdünnungsstufen jedes Organs auf kanamycinhaltige LB-Platten replikaplatziert und ausgezählt.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse von Funktions- und Strukturunterschieden von YadA aus *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*

4.1.1 YadA-vermittelte Adhäsion und Invasion in eukaryotische Zellen

Das zunächst als P1 bzw. Yop1 (Bolin *et al.*, 1982; Rosqvist & Wolf-Watz, 1986) beschriebene Außenmembranprotein YadA wird bei 37°C in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert. Es vermittelt eine effiziente Bindung enteropathogener Yersinien an Epithelzellen (Heesemann & Gruter, 1987). Um beurteilen zu können, ob YadA auch zu einer Invasion fähig ist, wurden die *yadA*-Gene aus *Y. pseudotuberculosis* (*yadA_{pstb}*) und *Y. enterocolitica* (*yadA_{ent}*) unter die Kontrolle des pBAD18-Promotors kloniert. Die *yadA*-Expression wurde in *E. coli* K-12 und *Y. pseudotuberculosis* YP31 (pIB1⁻, *inv*⁻) durch die Zugabe von Arabinose induziert. Dies ermöglichte bei den gewählten Versuchsbedingungen in Abwesenheit von VirF, dem transkriptionellen Aktivator der *yadA*-Expression, eine von anderen Virulenzfaktoren unbeeinflusste Analyse der YadA-vermittelten Invasion.

Abbildung 4.1 zeigt die relativen Adhäsions- und Invasionsraten nach einstündiger Infektion von humanen Epithelzellen (HEp-2) mit den verschiedenen YadA-exprimierenden Bakterien. Ein Vergleich der Adhäsionsraten verdeutlicht, dass sowohl bei der Expression in *E. coli* als auch in *Y. pseudotuberculosis* YP31 *YadA_{pstb}* und *YadA_{ent}* annähernd gleich stark an die Wirtszellen adhärten. Im Gegensatz zu dem ähnlichen Bindeverhalten der beiden YadA-Proteine kann jedoch bezüglich der Invasion ein sehr großer Unterschied zwischen *YadA_{pstb}* und *YadA_{ent}* festgestellt werden. So ergibt sich, vermittelt durch das YadA-Protein aus *Y. enterocolitica*, eine um ca. 90 % geringere Invasion. Absolut betrachtet konnten insgesamt ca. 20-30 % der eingesetzten Bakterien binden und 3-5 % der *YadA_{pstb}*-exprimierenden bzw. 0,3-0,5 % der *YadA_{ent}*-exprimierenden Bakterien in die Wirtszellen einwandern.

Diese Versuchsergebnisse machen deutlich, dass nur das *YadA_{pstb}*-Protein eine effiziente Einwanderung in eukaryotische Wirtszellen vermitteln kann. Es stellt damit neben Invasin einen zweiten Internalisationsfaktor für *Y. pseudotuber-*

culosis dar. Da die Expression von *inv* genau gegensätzlich zu der von *yadA* bereits bei moderaten Temperaturen während der stationären Wachstumsphase in Vollmedium erfolgt, kann davon ausgegangen werden, dass diese beiden Invasionsfaktoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion für *Y. pseudotuberculosis* von Bedeutung sind.

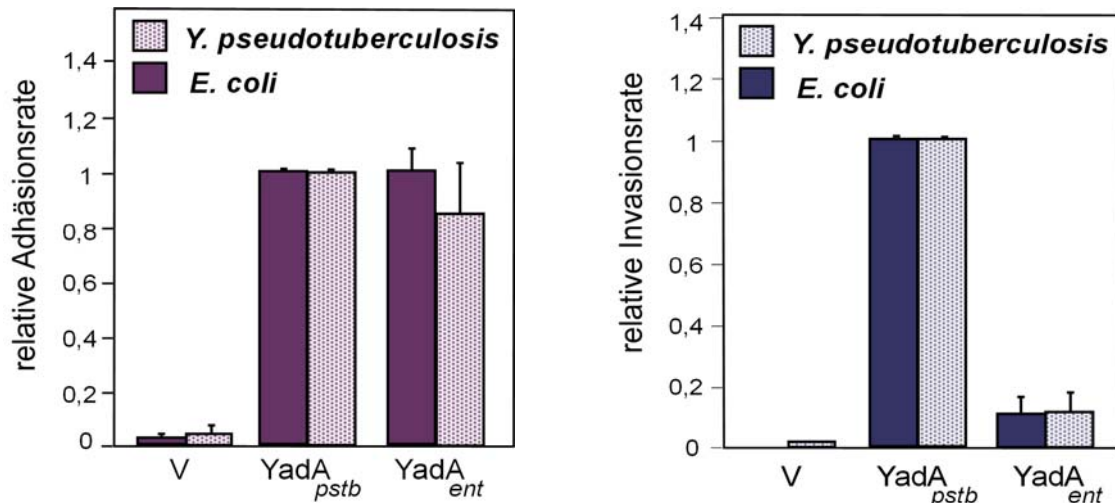


Abb. 4.1: Vergleich der Adhäsions- und Invasionsfähigkeit von YadA aus *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. Adhäsions- und Invasionsassays mit YadA-exprimierenden *E. coli* und *Y. pseudotuberculosis* YP31 Stämmen. Als Vektorkontrolle (V) wurde pBAD18 verwendet. 5×10^4 HEp-2 Zellen wurden mit 10^6 Bakterien infiziert. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von drei unabhängigen Assays und ist in Relation zu der auf den Wert 1 festgesetzten YadA_{pstb}-vermittelten Adhäsion bzw. Invasion dargestellt.

Parkhill & Thomson (2003) konnten zeigen, dass die enteropathogenen Spezies *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* weniger als 75 % Sequenzähnlichkeit aufweisen. Aus diesem Grund könnten genetische Unterschiede der YadA-Proteine für das beobachtete Einwanderungsverhalten verantwortlich sein.

4.1.2 Charakterisierung struktureller Unterschiede von YadA_{pstb} und YadA_{ent}

YadA ist ein Homotrimer, dessen „Lollipop“-förmige Strukturen die Bakterienoberfläche kapselähnlich bedecken. Innerhalb der Lollipops können drei Domänen unterschieden werden: Der C-Terminus bildet den Anker in der Außenmembran. Aus ihm geht eine Stiel-Region hervor, die mit einer Nacken-Region in die N-terminale Kopf-Domäne übergeht (Hoiczky *et al.*, 2000). Um mögliche strukturelle Ursachen für das unterschiedliche Invasionsvermögen von YadA_{pstb} und YadA_{ent} zu identifizieren, wurden die Aminosäuresequenzen von

39

In den letzten Jahren konnten durch Analysen verschiedener YadA_{ent}-Mutanten bereits einigen Bereichen bzw. Aminosäureregionen des YadA-Proteins bestimmte Funktionen zugeordnet werden. Die N-terminale Domäne scheint an der Bindung von Neutrophilen, EZM-Proteinen sowie der Autoagglutination beteiligt zu sein (Roggenkamp *et al.*, 1995, 1996; Tamm *et al.*, 1993; Tahir *et al.*, 2000). Dies lässt eine funktionelle Rolle dieser Domäne bei der YadA_{pstb}-vermittelten Invasion vermuten. Die im Kopfbereich von YadA_{pstb} zusätzlich lokalisierten 31 Aminosäuren könnten somit dafür verantwortlich sein, dass YadA_{pstb} effiziente Invasion vermittelt. Da bisher keine funktionelle Beteiligung der Stielregion an der Bindung oder Einwanderung in Zellen nachgewiesen werden konnte (Roggenkamp *et al.*, 2003), scheint den in YadA_{ent} hier zusätzlich vorhandenen Aminosäuren keine Bedeutung für das unterschiedliche Invasionsverhalten der beiden Proteine zuzukommen.

4.2 Identifikation einer invasionsspezifischen Domäne in YadA_{pstb}

Um zu analysieren, ob die in dem YadA_{ent}-Protein fehlenden 31 Aminosäuren eine funktionelle Rolle bei der Invasion von *Y. pseudotuberculosis* in eukaryotische Zellen einnehmen, wurde eine entsprechende Deletion der Aminosäuren 53-83 mittels 2-Schritt-PCR in das *yadA*-Gen aus *Y. pseudotuberculosis* eingeführt. Die Expression des *yadA*_{pstb}Δ53-83-Gens in *E. coli* K-12 und *Y. pseudotuberculosis* YP31 (pIB1⁻, *inv*⁻) stand, wie die der Wildtypgene, unter der Kontrolle des pBAD18-Promotors. Um in einem ersten Schritt auszuschließen, dass sich die eingeführte Deletion auf die Trimerisierung oder Oberflächenexposition des Proteins auswirkt, wurde die Außenmembran aus YadA-exprimierenden *Y. pseudotuberculosis* YP31 und *E. coli* K-12 Stämmen präpariert.

In Abbildung 4.3 A ist deutlich zu erkennen, dass die Deletion der 31 Aminosäuren keinen Einfluss auf die Trimerbildung und Oberflächenexposition des YadA_{pstb}Δ53-83-Proteins hat. YadA-Trimere sind gegenüber den denaturierenden Eigenschaften des SDS äußerst stabil, so dass sie in Außenmembranpräparationen als 180-200 kDa große Oligomere detektiert werden können (Eitel & Dersch, 2002; Roggenkamp *et al.*, 2003; Cotter *et al.*, 2006). Erwartungsgemäß war für das YadA_{pstb}Δ53-83-Protein im Vergleich zu dem YadA_{pstb}-Protein ein

Größenunterschied zu beobachten. Das $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}$ - und das YadA_{ent} -Protein gleichen sich hinsichtlich der Größe und des Bandenmusters unabhängig davon, ob die YadA-Derivate in *Y. pseudotuberculosis* YP31 (siehe Abbildung 4.3 A) oder *E. coli* K-12 (Daten nicht gezeigt) exprimiert wurden.

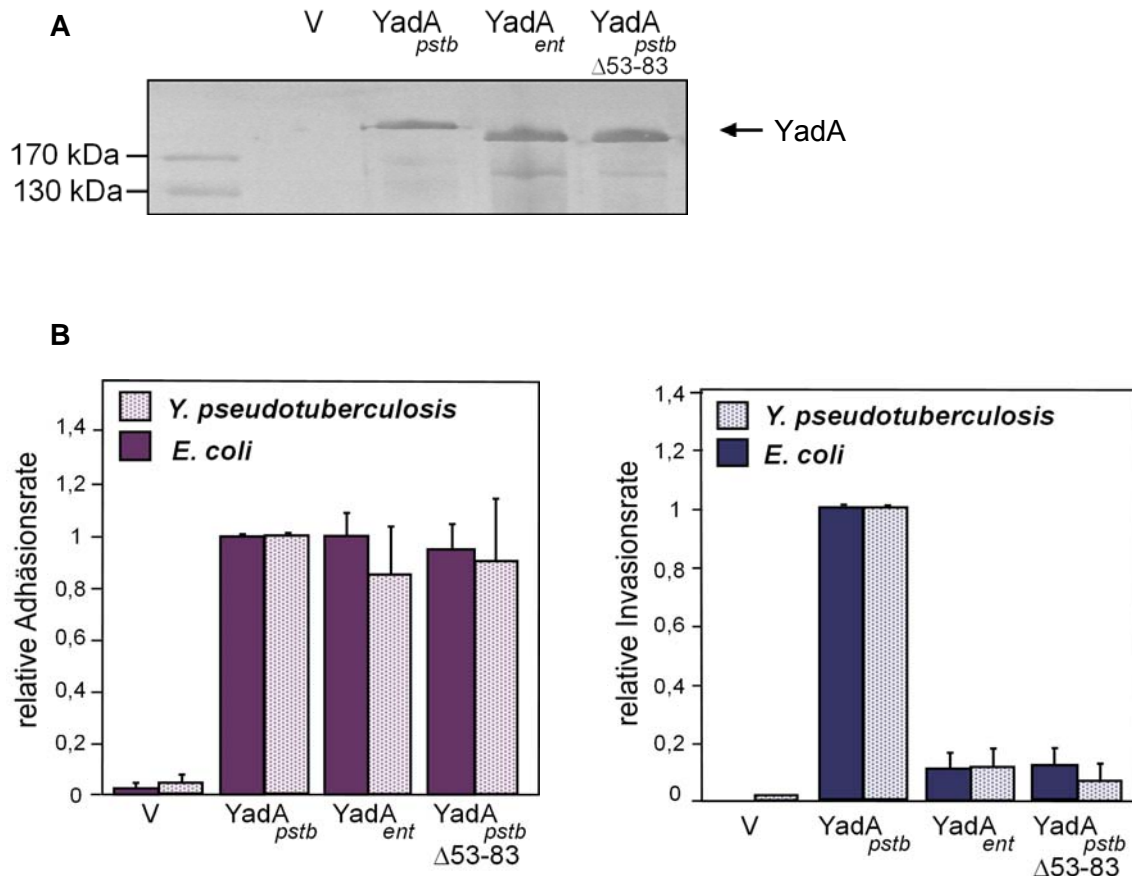


Abb. 4.3: YadA-Expression in der Außenmembran und YadA-vermittelte Adhäsion und Invasion. Als Vektorkontrolle (V) wurde pBAD18 verwendet. **(A)** Westernblot-Analyse von Außenmembranpräparationen von YadA-exprimierenden YP31 Stämmen. YadA wurde mit einem polyklonalen Antikörper detektiert. **(B)** Adhäsions- und Invasionsassays mit YadA-exprimierenden *E. coli* K-12 und *Y. pseudotuberculosis* YP31 Stämmen. 5×10^4 HEp-2 Zellen wurden mit 10^6 Bakterien infiziert. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von drei unabhängigen Assays und ist in Relation zu der auf den Wert 1 festgesetzten $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -vermittelten Adhäsion bzw. Invasion dargestellt.

Im Anschluss wurde mit Hilfe von Adhäsions- und Invasionsassays das Binde- und Einwanderungsverhalten $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}$ -exprimierender Bakterien untersucht. Diese binden, wie in Abbildung 4.3 B dargestellt, mit der gleichen Effizienz an Epithelzellen wie $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ - und YadA_{ent} -exprimierende Bakterien. Die Invasionsfähigkeit hingegen war durch die Deletion der 31 Aminosäuren im Vergleich zu $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ extrem abgeschwächt. Die $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}$ -vermittelte Invasion war sehr gering und entsprach der von YadA_{ent} -exprimierenden Bakterien. Demzufolge weisen das $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}$ - und das YadA_{ent} -Protein

ähnliche Adhäsions- und Invasionseigenschaften auf. Die 31 zusätzlichen Aminosäuren im N-terminalen Kopfbereich von $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ sind somit für die Invasion essentiell und scheinen eine invasionspezifische Subdomäne auszubilden. Die Adhäsionsfähigkeit des YadA-Proteins ist jedoch von dieser Domäne unabhängig.

4.3 Funktionelle Analyse von Aminosäuren innerhalb der invasionspezifischen Domäne von $\text{YadA}_{p\text{stb}}$

Nach der Identifikation der invasionspezifischen Domäne von $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ wurde durch gerichtete Mutagenese eine Reihe von Punktmutationen in dem Bereich der 31 Aminosäuren eingeführt (siehe Tabelle 4.1). Diese sollten Aufschluss über einzelne, für die Invasion kritische Aminosäuren geben. Vor allem geladene Aminosäuren und Proline wurden ausgetauscht, da sie eine wichtige Rolle bei der Interaktion anderer bakterieller Liganden mit ihren Rezeptoren spielen (Leong *et al.*, 1995; Jeng *et al.*, 2003). Proline kommen darüber hinaus sehr häufig in der Invasionsdomäne vor und könnten als α -Helix-brechende Aminosäure strukturbestimmend für den $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -Kopfbereich sein.

Tabelle 4.1: Übersicht der $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -Punktmutanten und ihrer Adhäsions- und Invasionsfähigkeiten. 5×10^4 HEp-2 Zellen wurden mit 10^6 YadA-exprimierenden Bakterien infiziert. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von drei unabhängigen Assays und ist in Relation zu der auf den Wert 1 festgesetzten $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -vermittelten Adhäsion bzw. Invasion dargestellt.

<i>E. coli</i> K-12	relative Adhäsionsrate	relative Invasionsrate
$\text{YadA}_{p\text{stb}}$	1	1
$\text{YadA}_{p\text{stb}}$ A58E	$0,6 \pm 0,23$	$0,24 \pm 0,17$
$\text{YadA}_{p\text{stb}}$ K59A	$0,7 \pm 0,2$	$0,31 \pm 0,15$
$\text{YadA}_{p\text{stb}}$ P60A	$0,86 \pm 0,03$	$0,68 \pm 0,11$
$\text{YadA}_{p\text{stb}}$ E65A	$0,99 \pm 0,12$	$0,96 \pm 0,15$
$\text{YadA}_{p\text{stb}}$ P70, 71A	$1,03 \pm 0,25$	$0,92 \pm 0,11$
$\text{YadA}_{p\text{stb}}$ K79A	$1,09 \pm 0,19$	$1,02 \pm 0,22$

Von den eingeführten Mutationen zeigten insgesamt nur zwei einen eindeutigen Effekt auf die $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -vermittelte Invasion (siehe Tabelle 4.1). Es handelte sich dabei um den Austausch des Alanins an Position 58 zu Glutamat, der einen

Ladungswechsel bedingte, und den Austausch des Lysins an Position 59 zu Alanin, wodurch es zu einem Ladungsverlust kam. Beide Mutationen beeinträchtigten die Oligomerisierung und die Expression der Proteine in der Außenmembran nicht (Abbildung 4.4 A), reduzierten aber deutlich die Fähigkeit in Epithelzellen einzuwandern (Abbildung 4.4 B). Die $\text{YadA}_{p_{stb}}\text{A58E-}$ bzw. $\text{YadA}_{p_{stb}}\text{K59A-}$ exprimierenden Bakterien zeigten im Vergleich zum $\text{YadA}_{p_{stb}}$ -Wildtyp eine um ca. 70 % verringerte Invasionsrate. Demnach war der Effekt der beiden Austausche nicht so stark wie bei der Deletion der gesamten 31 Aminosäuren. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass auch bereits die Adhäsionsleistung der $\text{YadA}_{p_{stb}}\text{A58E-}$ bzw. $\text{YadA}_{p_{stb}}\text{K59A-}$ exprimierenden Bakterien auf ca. 60-70 % reduziert war (Abbildung 4.4 B) und sich infolgedessen eine verringerte Invasionsleistung ergeben kann. Die beiden Mutationen wirkten sich somit nicht allein auf die Internalisation aus. Insofern kann der nahezu vollständige Verlust der Invasivität, der durch die Deletion der 31 Aminosäuren hervorgerufen worden war, nicht mit einzelnen Aminosäuren der Region in Verbindung gebracht werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass mehrere Aminosäuren für diese Eigenschaft von Bedeutung sind.

Zur weiteren Eingrenzung der invasionsspezifischen Aminosäuren wurde der Effekt von kürzeren Teil-Deletionen in der Invasionsdomäne auf die Bindung an und die Einwanderung in eukaryotische Zellen untersucht. Die Deletionen der Aminosäuren 53-67 und 68-83 hatten keine Auswirkung auf die Oligomerisierung und Expression der YadA-Proteine (Abbildung 4.4 A). Wie in Abbildung 4.4 B zu erkennen ist, entsprach die von ihnen vermittelte Adhäsion an HEp-2 Zellen annähernd der des $\text{YadA}_{p_{stb}}$ -Wildtypproteins. Die Invasionsfähigkeit dieser YadA-Varianten war dagegen signifikant auf ca. 30-50 % reduziert. Die Reduktion deutet zwar auf eine Bedeutung der 15 bzw. 16 Aminosäuren für das Invasionsverhalten hin, der eindeutigste und drastischste Einfluss ging jedoch von der Deletion der gesamten Aminosäureregion aus. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass für die von dem $\text{YadA}_{p_{stb}}$ -Protein effizient vermittelte Invasion alle bzw. diverse Aminosäuren der Invasionsdomäne verantwortlich sind. Denkbar ist, dass durch das Vorhandensein der 31 Aminosäuren eine bestimmte Konformation des $\text{YadA}_{p_{stb}}$ -Proteins begünstigt wird, die für dessen Invasionsfähigkeit essentiell ist.

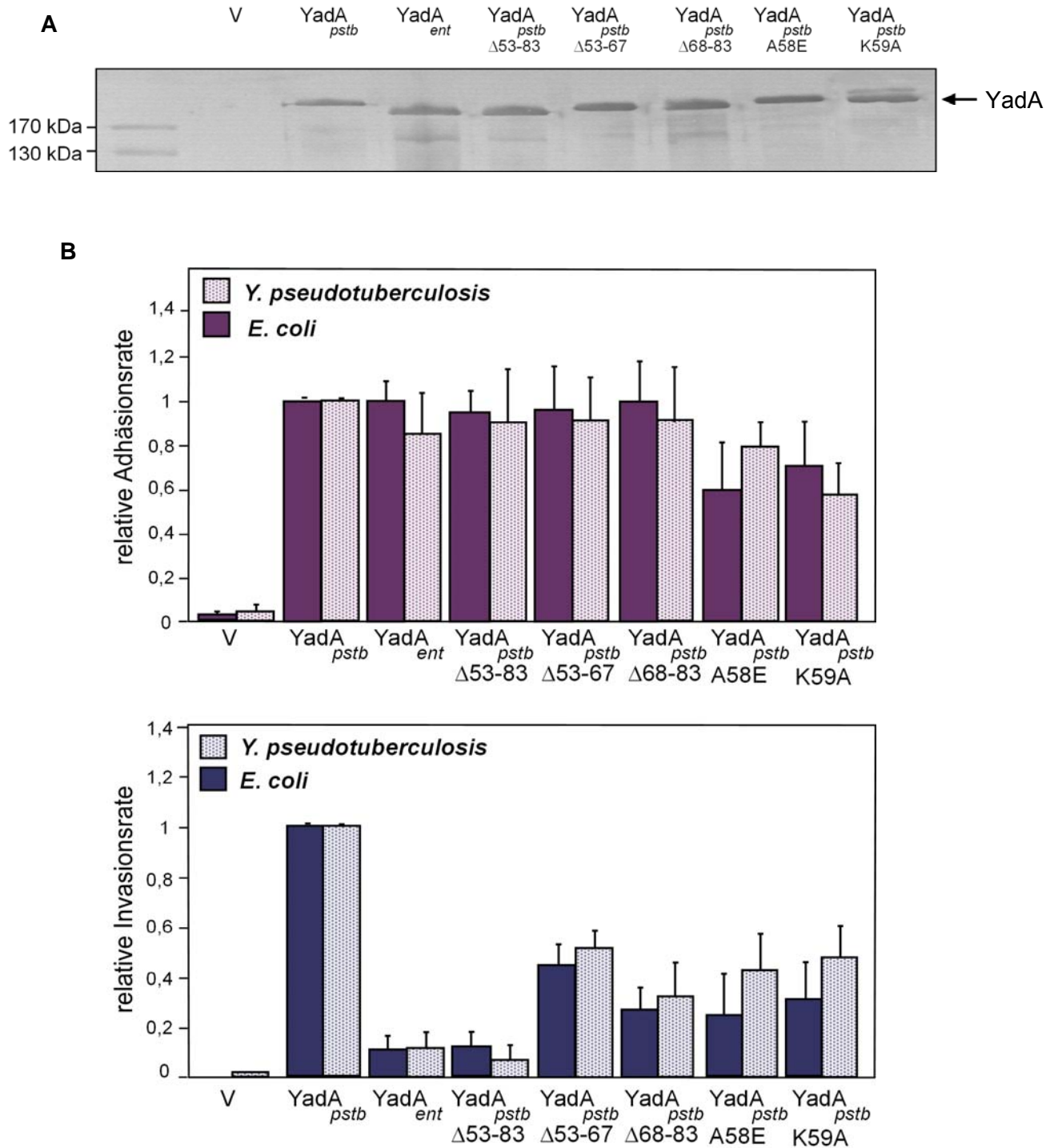


Abb.4.4: YadA-Expression in der Außenmembran und YadA-vermittelte Adhäsion und Invasion. Als Vektorkontrolle (V) wurde pBAD18 verwendet. **(A)** Westernblot-Analyse von Außenmembranpräparationen YadA-exprimierender YP31 Stämme. YadA wurde mit einem polyklonalen Antikörper detektiert. **(B)** Adhäsions- und Invasionsassays mit YadA-exprimierenden *E. coli* K-12 und *Y. pseudotuberculosis* YP31 Stämmen. 5×10^4 HEp-2 Zellen wurden mit 10^6 Bakterien infiziert. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von drei unabhängigen Assays und ist in Relation zu der auf den Wert 1 festgesetzten YadA_{pstb}-vermittelten Adhäsion bzw. Invasion dargestellt.

4.4 Bedeutung der Invasionsdomäne für weitere Virulenzeigenschaften von $\text{YadA}_{p\text{stb}}$

4.4.1 Auswirkungen auf die YadA -vermittelte Auto- und Hämagglutination

Wie in früheren Studien gezeigt werden konnte, haben YadA -exprimierende Bakterien die Fähigkeit, aufgrund hydrophober Interaktionen zwischen den Domänen der Kopfregion zu aggregieren (Skurnik *et al.*, 1984; Balligand *et al.*, 1985). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann man erkennen, wie die YadA -Lolipops bei der Autoagglutination, ähnlich einem Reißverschluss, miteinander in Kontakt treten (Hoiczky *et al.*, 2000; El Tahir & Skurnik, 2001). Es wird diskutiert, dass die Autoagglutination die Bildung von Mikrokolonien in infizierten Geweben oder Organen induzieren bzw. stabilisieren könnte (Hendrixson & St. Geme, 1998).

Um die Bedeutung der Aminosäuren 53-83 für die aggregativen Eigenschaften des $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -Proteins zu bestimmen, wurde zunächst die Autoagglutination untersucht. Dazu wurde das schnelle Absinken der Bakterien von Übernachtskulturen YadA -exprimierender *E. coli* K-12 und *Y. pseudotuberculosis* YP31 Stämme am Gefäßboden bei unbewegter Inkubation bei Raumtemperatur beobachtet. Für die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Autoagglutination wurde darüber hinaus die infolge des Absinkens der Bakterien abnehmende optische Dichte gemessen.

Wie in Abbildung 4.5 A und B deutlich wird, autoagglutinieren die $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -exprimierenden Bakterien innerhalb von 10 Minuten, so dass sich das Nährmedium nahezu vollständig aufklart. Im Gegensatz dazu aggregieren Bakterien, die YadA_{ent} oder $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}$ exprimieren, auch während eines Beobachtungszeitraums von zwei Stunden nicht. Dies war unabhängig davon, ob die YadA -Derivate in *Y. pseudotuberculosis* YP31 (Daten nicht gezeigt) oder *E. coli* K-12 exprimiert wurden, zu beobachten

Die Bildung eines bakteriellen Biofilms stellt einen Schutzmechanismus gegen die Abwehrreaktionen des Wirtes und die Wirkung antimikrobieller Peptide dar (Donlan *et al.*, 2002). Bei einer Kultivierung $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -exprimierender Bakterien bei 37°C konnte eine deutlich sichtbare Biofilmbildung am Rand des Kulturgefäßes festgestellt werden (Abbildung 4.5 B).

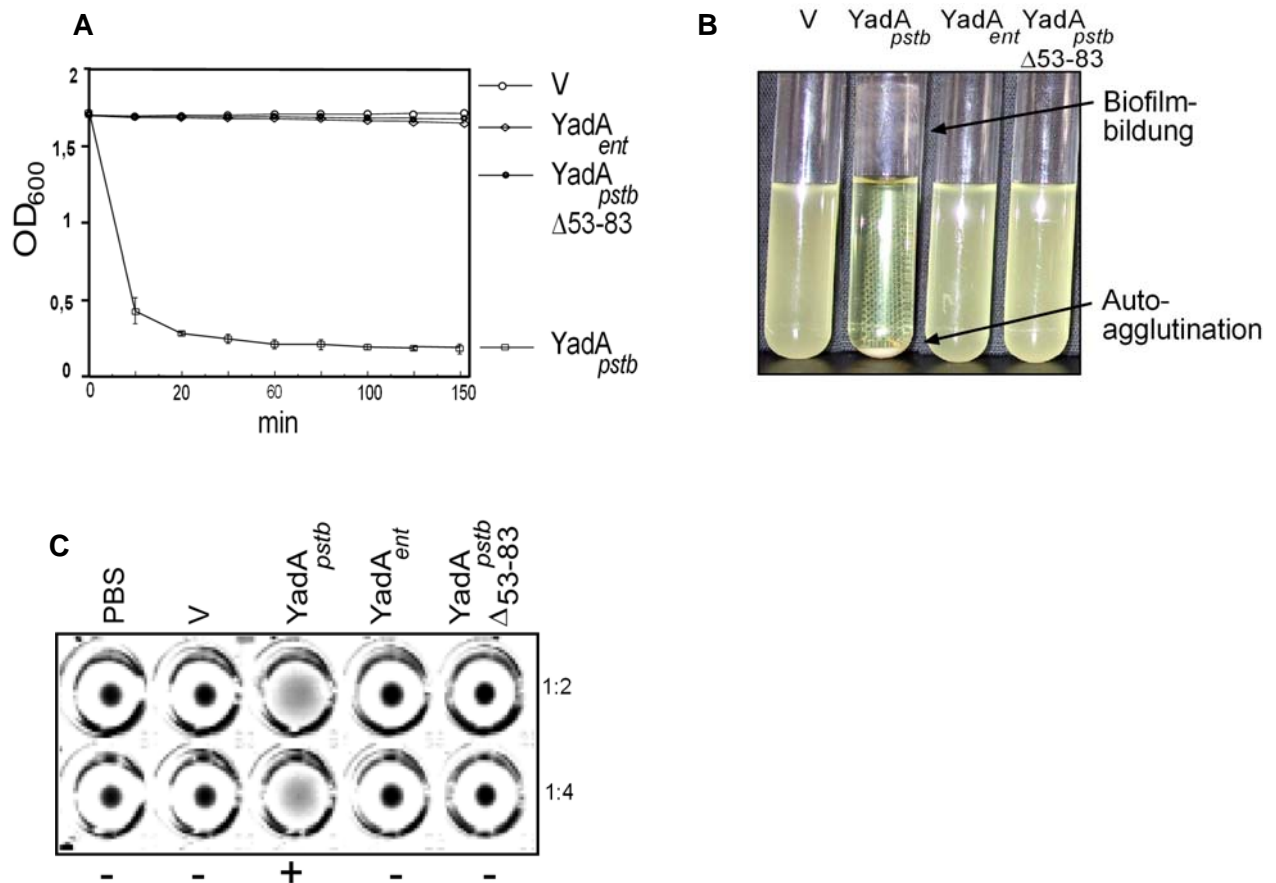


Abb 4.5: Autoagglutination, Biofilmbildung und Hämagglutination YadA-exprimierender *E. coli* K-12. Als Vektorkontrolle (V) wurde pBAD18 verwendet. **(A)** Dokumentation der Autoagglutination mittels Messung der Abnahme der OD₆₀₀ von Übernachtskulturen. **(B)** Fotografische Dokumentation des Absetzens der Bakterien einer Übernachtskultur und des bei der Kultivierung bei 37°C am Rand des Kulturgefäßes gebildeten Biofilms. **(C)** YadA-exprimierende Bakterien wurden zusammen mit 2 %iger Schafserythrozytensuspension nach kurzem Schütteln für 15 Minuten unbewegt inkubiert. Im Fall der Hämagglutination bleiben die Erythrozyten in Suspension und sinken nicht auf den Boden des Reaktionsgefäßes ab.

Neben der Fähigkeit zur Autoagglutination wurde für YadA auch das Agglutinieren von Erythrozyten gezeigt (Kapperud *et al.*, 1985). Werden YadA-exprimierende Bakterien mit Schafserythrozyten inkubiert, ist zu erkennen, dass nur YadA_{pstb} in der Lage ist, die Erythrozyten zu binden und in Suspension zu lassen (Abbildung 4.5 C).

Die Analysen zeigen deutlich, dass die 31 Aminosäuren in der Kopfdomäne nicht nur für die Fähigkeit zur Einwanderung, sondern auch für das Aggregationsverhalten der Bakterien und die Biofilmbildung von entscheidender Bedeutung sind. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass YadA_{pstb} und YadA_{ent} bei der Besiedlung und Persistenz im Wirt eine unterschiedliche Funktion einnehmen könnten.

4.4.2 Auswirkungen auf die YadA-vermittelte Serumresistenz

Die Expression von YadA stellt für die Bakterien einen Schutz vor dem bakteriolytischen Effekt des humanen Serums dar (Pilz *et al.*, 1992; China *et al.*, 1993; Roggenkamp *et al.*, 1996). Es wird angenommen, dass YadA den Komplement-hemmenden Faktor H bindet und somit C3b inaktiviert (China *et al.*, 1993, 1994; Biedzka-Sarek *et al.*, 2005). Dies resultiert in einer verminderten Opsonisierung der Bakterien.

Um den Einfluss der 31 Aminosäuren der Kopfdomäne auf die YadA vermittelte Serumresistenz zu analysieren, wurden Überlebensexperimente durchgeführt. YadA-exprimierende *E. coli* K-12 wurden für eine Stunde in 5 %igem Serum bei 37°C inkubiert und anschließend auf LB-Platten ausplattiert. Die Überlebensrate wurde in Relation zu einem Kontrollansatz, bei dem eine Inkubation mit MgCl₂ bzw. inaktivem Serum erfolgte, bestimmt. Dieses Experiment verdeutlichte, dass alle drei YadA-Proteine (YadA_{pstb}, YadA_{ent} und YadA_{pstb}Δ53-83) einer Abtötung der Bakterien entgegenwirken können (siehe Tabelle 4.2). Das Ergebnis stimmt mit den Daten von Roggenkamp *et al.* (2003) überein, die zeigten, dass die Kopf- und Nackendomäne von YadA_{ent} für die Serumresistenz nicht von Bedeutung sind.

Tabelle 4.2: Serumresistenz YadA-exprimierender *E. coli* K-12. Die dargestellten Werte geben im Vergleich zu einem Kontrollansatz (MgCl₂) an, wieviel Prozent der eingesetzten Bakterien die Seruminkubation überlebten. Als Vektorkontrolle (V) wurde pBAD18 verwendet.

<i>E. coli</i> K-12	Serumresistenz in %
V	0,4 ± 0,5
YadA _{pstb}	44,8 ± 14,9
YadA _{ent}	33,4 ± 11,6
YadA _{pstb} Δ53-83	51,6 ± 10,1

4.4.3 Auswirkungen auf die IL-8-Sekretion

Der Hauptinvasionsfaktor enteropathogener Yersinien, das Invasin-Protein, induziert die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-8 (IL-8) (Schulte *et al.*, 2000; Eitel *et al.*, 2005). IL-8 ist ein wichtiger chemotaktischer Faktor für die Migration von polymorphkernigen Neutrophilen zu einem Infektionsort. Yersinien

sind jedoch gegenüber einer Phagozytose durch PMNs resistent, und so wird deren Anlockung durch die Induktion der IL-8-Sekretion als eine Pathogenitätsstrategie diskutiert. Aufgrund der Einwanderung der PMNs werden Zell-Zell-Kontakte gelöst, wodurch die Besiedlung tiefer liegender Gewebe für die Bakterien erleichtert werden könnte (Autenrieth & Firsching, 1996, McCormick *et al.*, 1997). Mit Hilfe eines IL-8-Elisas wurde untersucht, inwieweit auch YadA die Induktion der IL-8-Sekretion auslösen kann. HEp-2 Zellen wurden mit YadA-exprimierenden Bakterien für vier Stunden infiziert und anschließend über Nacht in gentamycinhaltigem Bindepuffer inkubiert. Die Zellüberstände dieser Infektionsversuche wurden für IL-8-Elisas verwendet.

Wie Abbildung 4.6. zeigt, kann $\text{YadA}_{p_{stb}}$ eine ähnlich starke IL-8-Sekretion induzieren wie das Invasin-Protein. Auch YadA aus *Y. enterocolitica* und das $\text{YadA}_{p_{stb}\Delta 53-83}$ -Protein induzieren die IL-8-Sekretion. Da diese beiden Proteine im Vergleich zu $\text{Inv}_{p_{stb}}$ und $\text{YadA}_{p_{stb}}$ nicht in der Lage sind in Wirtszellen einzuwandern, macht dieses Ergebnis deutlich, dass die IL-8-Sekretion unabhängig von der Einwanderung der Bakterien erfolgt und allein als Reaktion auf die starke Bindung der Bakterien an die Zellen ausgelöst wird. Die Induktion der IL-8-Sekretion erfolgt demnach unabhängig vom Vorhandensein der potentiellen Invasionsdomäne.

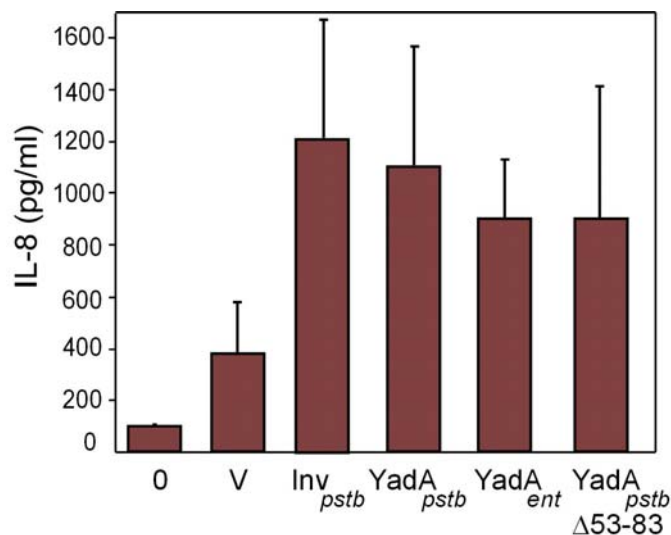


Abb. 4.6: Induktion der IL-8-Sekretion. 5×10^4 HEp-2 Zellen wurden für 4 h mit 10^6 YadA-exprimierenden Bakterien infiziert. Die IL-8-Sekretion wurde mittels eines spezifischen Elisas bestimmt. Als Vektorkontrolle (V) wurde pBAD18 verwendet, (0) zeigt die IL-8-Sekretion unbehandelter Zellen.

4.5 Charakterisierung der YadA_{pstb}-vermittelten Invasion

4.5.1 Analyse der Bindekapazitäten der YadA-Proteine an Proteine der extrazellulären Matrix

Eitel *et al.* (2002) konnten zeigen, dass die YadA_{pstb}-vermittelte Invasion durch die Bindung an Fibronectin erfolgt. Dabei fungiert Fibronectin als Brückenmolekül zwischen den Bakterien und den transmembranen Wirtszellrezeptoren, den β_1 -Integrinen. Deren zytoplasmatische Anteile können Signaltransduktionskaskaden induzieren, die eine Rearrangierung des Zytoskeletts und die Aufnahme der Bakterien zur Folge haben (Hynes, 1999; Wong *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnte eine Bindung von YadA an weitere Moleküle der extrazellulären Matrix (EZM), wie Kollagen und Laminin, beobachtet werden (Tamm *et al.*, 1993; Roggenkamp *et al.*, 1995). Verschiedene Bindekapazitäten der YadA-Derivate zur extrazellulären Matrix könnten möglicherweise für deren unterschiedliche Invasionseigenschaften verantwortlich sein. Aus diesem Grund wurden die Bindekapazitäten von YadA_{pstb}, YadA_{ent} und YadA_{pstb} Δ 53-83 an Fibronectin, Kollagen und Laminin genauer analysiert. Über Nacht wurde Glas oder Plastik mit je 10 μ g/ml der unterschiedlichen EZM-Proteine beschichtet. Für eine Analyse der Fibronectinbindung war es notwendig, die gebundenen Bakterien bei mikroskopischer Betrachtung auszuzählen.

Während YadA_{pstb}-exprimierende Bakterien erwartungsgemäß eine starke Bindung an zelluläres Fibronectin zeigten (Abbildung. 4.7), war die Bindekapazität von YadA_{ent} oder YadA_{pstb} Δ 53-83-exprimierenden Bakterien demgegenüber um 86 % reduziert. Die durchgeführten Bindestudien zu den EZM-Molekülen Laminin und Kollagen ergaben, dass die beiden nicht-invasiven YadA_{ent} und YadA_{pstb} Δ 53-83-Proteine für diese EZM-Moleküle dagegen eine sehr hohe Bindefähigkeit besitzen. Insgesamt haben deutlich mehr YadA-exprimierende Bakterien an Kollagen und Laminin gebunden, so dass bei diesen beiden EZM-Proteinen die Bindung durch Anfärben der Bakterien mit Kristallviolett und anschließende Detektion der Farbintensität bei 595 nm nachgewiesen werden konnte.

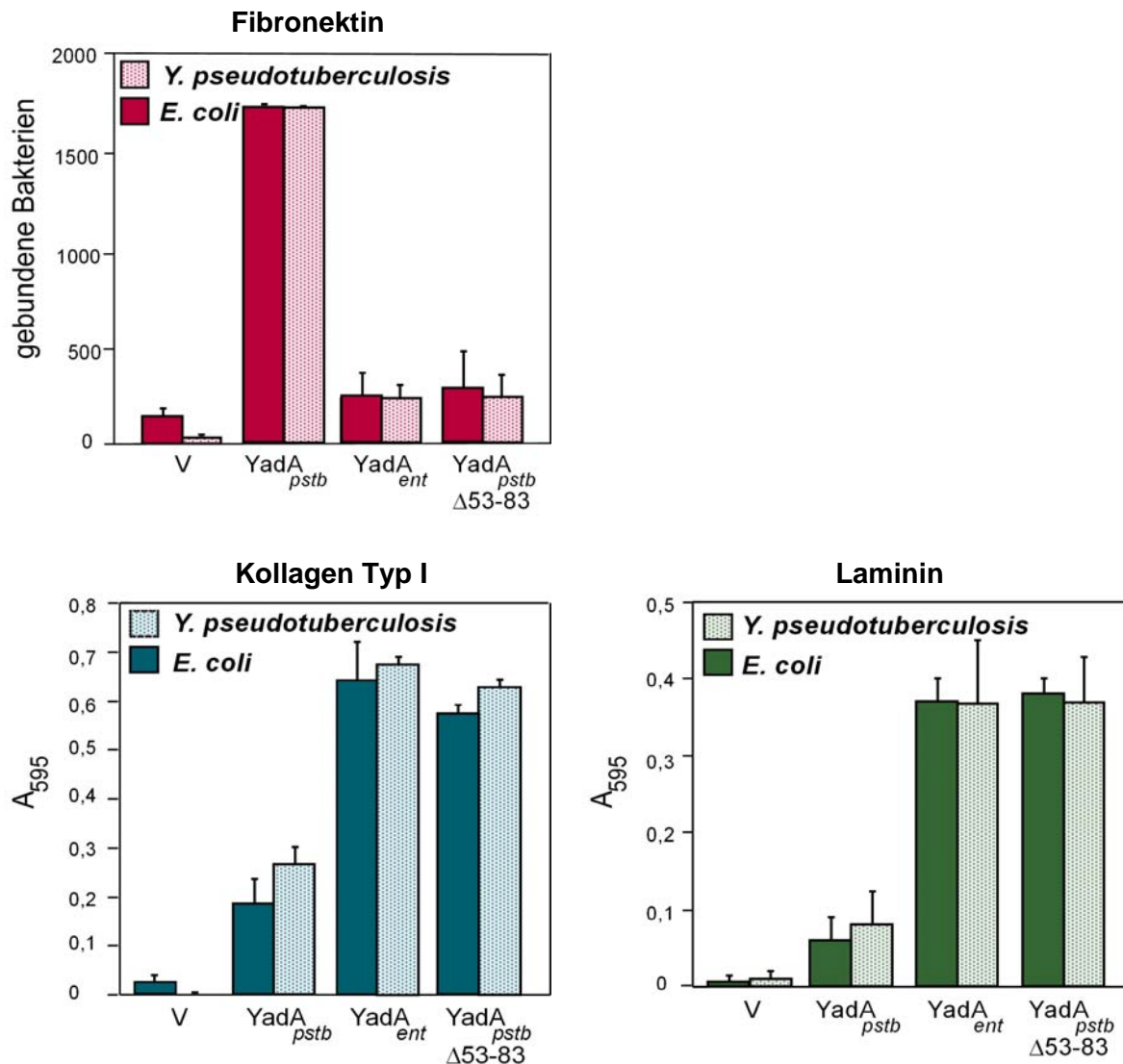


Abb. 4.7: Bindekapazitäten YadA-exprimierender Bakterien an verschiedene Proteine der EZM. Je 10 µg/ml Kollagen, Laminin und Fibronectin wurden benutzt, um Plastik oder Glas über Nacht zu beschichten. Die Detektion daran gebundener, YadA-exprimierender Bakterien erfolgte entweder durch Anfärben mit Kristallviolett und anschließender Detektion der Farbintensität bei 595 nm oder durch Auszählen fibronektin-gebundener Bakterien bei mikroskopischer Betrachtung. Als Vektorkontrolle (V) wurde pBAD18 verwendet.

Das YadA_{pstb}-Protein zeigte im Gegensatz zu den beiden anderen YadA-Proteinen eine geringere Affinität für Laminin und Kollagen. Verglichen mit YadA_{ent} und YadA_{pstb}Δ53-83 konnten 65 % weniger YadA_{pstb}-exprimierende Bakterien an Kollagen und 80 % weniger an Laminin binden.

Die Ergebnisse belegen, dass ein Fehlen der Domäne der 31 Aminosäuren die Bindungsspezifität des YadA_{pstb}-Proteins gegenüber Molekülen der extrazellulären Matrix verändert. Nur wenn diese Domäne vorhanden ist, kann das YadA-Protein an Fibronectin binden. Die Deletion dieser Region resultierte dagegen in einer drastischen Verringerung der Bindefähigkeit an Fibronectin und einer

Verstärkung der Bindefähigkeit an Kollagen und Laminin. Darüber hinaus kann ein Zusammenhang zwischen der Invasionsfähigkeit und der Bindungsspezifität an verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix festgestellt werden: YadA-exprimierende Bakterien, die stark an Kollagen und Laminin binden, sind lediglich in der Lage an Epithelzellen zu adhären, während die Invasion ausschließlich von den Bakterien vermittelt wird, die zur Fibronectinbindung fähig sind.

4.5.2 Analyse der Bedeutung verschiedener EZM-Moleküle und β_1 -Integrin-Klassen für die YadA-vermittelte Invasion

Um zu untersuchen, inwiefern die Bindefähigkeiten der verschiedenen YadA-Proteine an die EZM-Moleküle Kollagen, Laminin und Fibronectin für die Invasion von Bedeutung sind, wurden Invasionsassays mit inhibierenden Antikörpern durchgeführt. Hierzu wurden HEP-2 Zellen vor Zugabe der Bakterien mit gegen Kollagen, Laminin und Fibronectin gerichteten Antikörpern inkubiert.

In Abbildung 4.8 A ist zu erkennen, dass die YadA_{pstb}-vermittelte Invasion durch gegen Kollagen Typ I gerichtete Antikörper nicht beeinträchtigt wird. Auch die Präinkubation mit Laminin-Antikörpern reduziert die Anzahl aufgenommener Bakterien lediglich um 10 %. Im Gegensatz dazu führte die dreißigminütige Vorinkubation der HEP-2 Zellen mit monoklonalen Fibronectin-Antikörpern zu einer drastischen Reduktion der YadA_{pstb}-vermittelten Invasion um 68 %.

Die geringe Einwanderungsrate, die von den YadA_{pstb} Δ 53-83- und YadA_{ent}-Proteinen vermittelt wird, blieb durch alle Antikörperbehandlungen nahezu unbeeinflusst und konnte auch nicht durch die Blockierung von Kollagen und Laminin regeneriert werden. Die Invasionsdefizienz dieser YadA-Derivate ist daher nicht nur in der erhöhten Affinität für Kollagen und Laminin begründet. Eine starke Bindefähigkeit an Fibronectin scheint für die Invasion essentiell zu sein.

Wie auch die anderen EZM-Moleküle bindet Fibronectin an transmembrane Rezeptoren der Wirtszelle, die β_1 -Integrine. Dabei ist ein aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Aspartat (RGD) bestehendes Motiv im Fibronectin als Erkennungssequenz für die Bindung wichtig. Um die Bedeutung des Fibronectins für die YadA-vermittelte Invasion genauer aufzuklären, wurde untersucht, welchen Einfluss die Präinkubation von HEP-2 Zellen mit synthetischen funktions-

blockierenden GRGDSP Peptiden auf die Invasionsrate $\text{YadA}_{\text{pstb}}$ -exprimierender Bakterien hat.

In Abbildung 4.8 B ist zu erkennen, dass die Absättigung der Integrine mit GRGDSP-Peptiden und die dadurch bedingte Verhinderung der Fibronektinbindung zu einer Reduktion der Invasion führt. Diese ist ähnlich stark wie beim Einsatz von Fibronektinantikörpern verringert. Ein Kontrollpeptid GRGESP zeigte dagegen keinen Effekt. Dieses Ergebnis bestätigt die direkte Beteiligung des Fibronektins an der $\text{YadA}_{\text{pstb}}$ -vermittelten Invasion.

β_1 -Integrine haben in Abhängigkeit von der α -Untereinheit, mit der sie ein Heterodimer bilden, unterschiedliche Funktionen und Eigenschaften. So sind sie auch in die Signaltransduktion involviert, die zur Umlagerung des Zytoskeletts und zur Aufnahme der Bakterien führt (Wong *et al.*, 2005). Fibronektin wird hauptsächlich von $\alpha_5\beta_1$ - und $\alpha_v\beta_1$ -Integrinen gebunden, die jedoch nicht mit Kollagen und Laminin interagieren. Laminin bindet bevorzugt an $\alpha_3\beta_1$ -Integrine und Kollagen an $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Integrine (Eble *et al.*, 1997; Hynes, 2002). Da YadA_{ent} und $\text{YadA}_{\text{pstb}\Delta 53-83}$ eine starke Bindung an Kollagen und Laminin, nicht aber an Fibronektin aufweisen, ist denkbar, dass diese Integrine nicht in den Internalisierungsprozess involviert sind.

Um die funktionelle Rolle der verschiedenen Integrine für den Einwanderungsprozess zu untersuchen, wurden Invasionsassays mit inhibierenden, gegen unterschiedliche Klassen von Integrinen gerichtete Antikörpern durchgeführt. Nur Antikörper, die gegen die am häufigsten auf Epithelzellen exprimierten $\alpha_5\beta_1$ -Integrine gerichtet waren, verursachten eine drastische Reduktion der Invasion (Abbildung 4.8 B). Auch die Blockierung der einzelnen Untereinheiten dieses Integrin-Heterodimers reduzierte die Aufnahme der Bakterien. In Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Antikörper konnte eine nahezu vollständige Inhibition der Internalisierung der Bakterien beobachtet werden. Von Antikörpern, die gegen die α -Untereinheiten 1, 2, 3, 4 und v gerichtet sind, ging kein negativer Effekt auf die $\text{YadA}_{\text{pstb}}$ -vermittelte Invasion aus. Dies verdeutlicht, dass nur fibronektinbindende, nicht aber kollagen- bzw. lamininbindende Integrine an der YadA -vermittelten Invasion beteiligt sind.

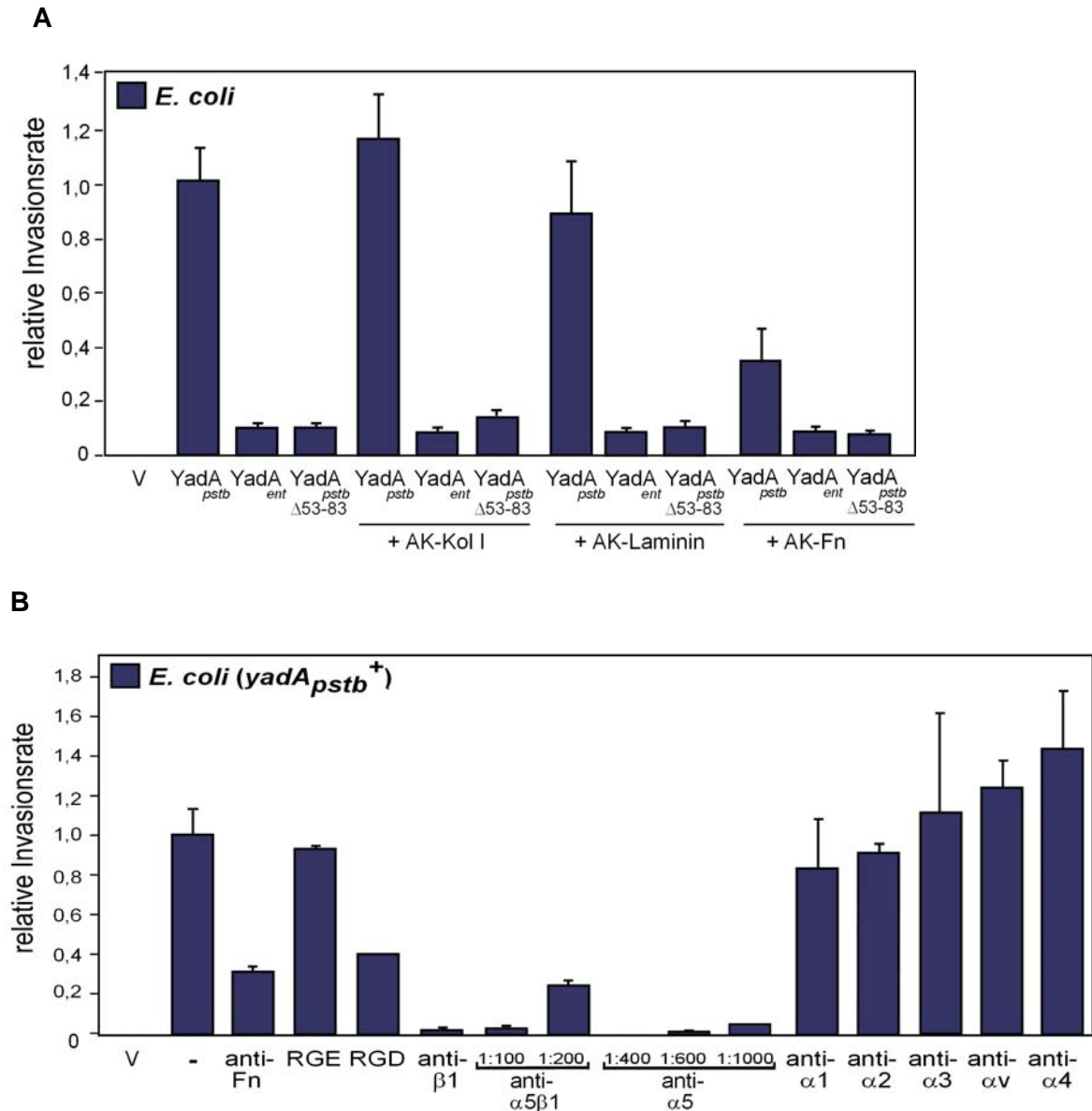


Abb. 4.8: Einfluss inhibierender Antikörper gegen EZM-Moleküle (A) und Integrine (B) auf die YadA-vermittelte Invasion. HEp-2 Zellen wurden vor der Infektion mit YadA-exprimierenden Bakterien mit verschiedenen Antikörpern unterschiedlicher Konzentration für 30 min vorinkubiert. Verwendet wurden die folgenden Antikörper: Anti-Fibronektin (Calbiochem und Sigma), anti-Kollagen Typ I und II (Chemicon und Sigma), anti-Laminin (Chemicon), GRGDSP- und GRGESP-Peptide (GibcoBRL), monoklonale Integrin-blockierende Antikörper gegen α_1 5E8D (Upstate), α_2 (Chemicon), α_3 P1B5 (Chemicon), α_4 P1H4 (Chemicon), α_5 BIIG2 (Hybridoma Bank, University of Iowa), $\alpha_5\beta_1$ (Chemicon), α_v M9 (Chemicon) und β_1 4B7 (Calbiochem). Als Vektorkontrolle (V) wurde pBAD18 verwendet. Die Invasionsraten sind relativ zu der auf den Wert 1 festgesetzten Invasion von YadA_{pstb}-exprimierenden Bakterien in unbehandelte Zellen angegeben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Internalisation in HEp-2 Zellen ausschließlich infolge der Bindung von $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen induziert wird. Daraus folgt, dass die starke Bindung von YadA_{ent} und YadA_{pstb}Δ53-83 an die extrazellulären Matrixproteine Kollagen und Laminin, die bevorzugt an α_1 -, α_2 und $\alpha_3\beta_1$ -Integrine binden, keine Aufnahme der Bakterien bewirken kann.

4.6 Bedeutung der YadA-vermittelten Invasion für den Infektionsprozess

Die Expression des YadA-Proteins erfolgt bei Temperaturen und Nährstoffbedingungen, wie sie im tierischen oder menschlichen Wirt herrschen (Eitel *et al.*, 2002). Für YadA kann daher eine Bedeutung im Infektionsverlauf kurz nach der zumeist oralen Aufnahme der Bakterien angenommen werden. Die Fähigkeiten von YadA_{pstb}, Invasion durch die Bindung an Fibronectin zu vermitteln, zu autoagglutinieren und Erythrozyten zu agglutinieren, könnten im Vergleich zu YadA_{pstb}Δ53-83 einen Vorteil bei der Infektion darstellen. Um den Einfluss dieser Eigenschaften auf den Infektionsprozess zu untersuchen, wurden Tierversuche durchgeführt. Für diesen Zweck wurde mit Hilfe des RED Recombinase Systems (Derbise *et al.*, 2003) eine *yadA*-Knockout-Mutante hergestellt. Diese konnte genutzt werden, um die isogenen *Y. pseudotuberculosis* Stämme YP45 (*yadA*⁺) und YP46 (*yadA*Δ53-83) zu erzeugen. Zwei Gruppen von acht Balb/c Mäusen wurden oral mit den *Y. pseudotuberculosis* Stämmen YP45 (*yadA*⁺), YP46 (*yadA*Δ53-83) und YP47 (*yadA*⁻) infiziert. Nach zwei Tagen wurde die bakterielle Besiedlung der Peyerschen Plaques, der mesenterialen Lymphknoten und der Milz bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen übereinstimmend mit Daten von Han *et al.* (1997), dass auch der YadA-negative Stamm YP47 zur Kolonisation befähigt ist. Im Vergleich zu der Kolonisation durch den YadA-positiven Stamm YP45 konnte jedoch eine um zwei Zehnerpotenzen geringere Anzahl an Bakterien in den Peyerschen Plaques, den mesenterialen Lymphknoten und der Milz detektiert werden (Abbildung 4.9). Ebenso war die Zahl der detektierbaren Bakterien des Stammes YP46 (*yadA*Δ53-83) in den Organen signifikant gegenüber der des Stammes YP45 (*yadA*⁺) reduziert und entsprach denen des YadA-negativen Stammes YP47. Dies deutet darauf hin, dass sich der Verlust der YadA_{pstb}-vermittelten Invasivität und Aggregationseigenschaften auf die Besiedlung und Verbreitung von *Y. pseudotuberculosis* in den Organen auswirkt und den Infektionsprozess abschwächt.

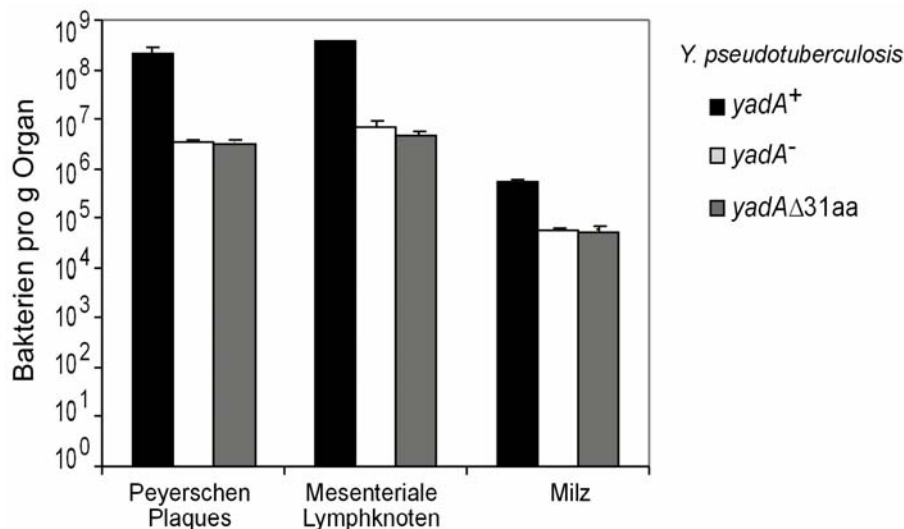


Abb. 4.9: Bedeutung der *YadA_{pstb}*-Invasionsdomäne für den Infektionsprozess. 2 Gruppen von 8 weiblichen Balb/c Mäusen wurden mit 5×10^9 Bakterien oral infiziert. Zwei Tagen nach der Infektion wurde die Anzahl der Bakterien in den Peyerschen Plaques, den mesenterialen Lymphknoten und der Milz nach Präparation und Homogenisation der Organe durch Ausplattieren bestimmt.

4.7 Einfluss der invasionsdefizienten *YadA*-Proteine auf die Invasin-vermittelte Invasion

YadA und *Invasin* sind die beiden wichtigsten Adhäsine bzw. Invasine in *Y. pseudotuberculosis*. Da sie bei gegensätzlichen Umweltbedingungen exprimiert werden, werden für sie auch unterschiedliche Rollen im Infektionsverlauf angenommen. *Invasin*, das bereits bei Bedingungen, wie sie in der externen Umwelt vorliegen, produziert wird, ist wahrscheinlich besonders für die initiale Phase der Infektion, das Anheften und Penetrieren der M-Zellen im Darmepithel wichtig (Ellison *et al.*, 2004). Demgegenüber kommt *YadA* eher zu einem späteren Zeitpunkt eine Bedeutung zu (Eitel, unveröffentlichte Daten). Beide Proteine sind in der bakteriellen Außenmembran verankert und zwischen 18 und 23 nm lang (Heesemann *et al.*, 2006), wobei das *YadA*-Protein das *Invasin*-Protein in *Y. pseudotuberculosis* nur leicht, in *Y. enterocolitica* jedoch deutlich in seiner Größe überragt (Abbildung 4.10). Eitel & Dersch (2002) konnten bereits zeigen, dass sich die Proteine aus *Y. pseudotuberculosis* im Fall des gleichzeitigen Vorhandenseins in der bakteriellen Außenmembran in ihrer Funktion ergänzen. Noch unbekannt ist, ob die invasionsdefizienten *YadA*-Proteine einen negativen Effekt auf die *Invasin*-vermittelte Invasion haben.

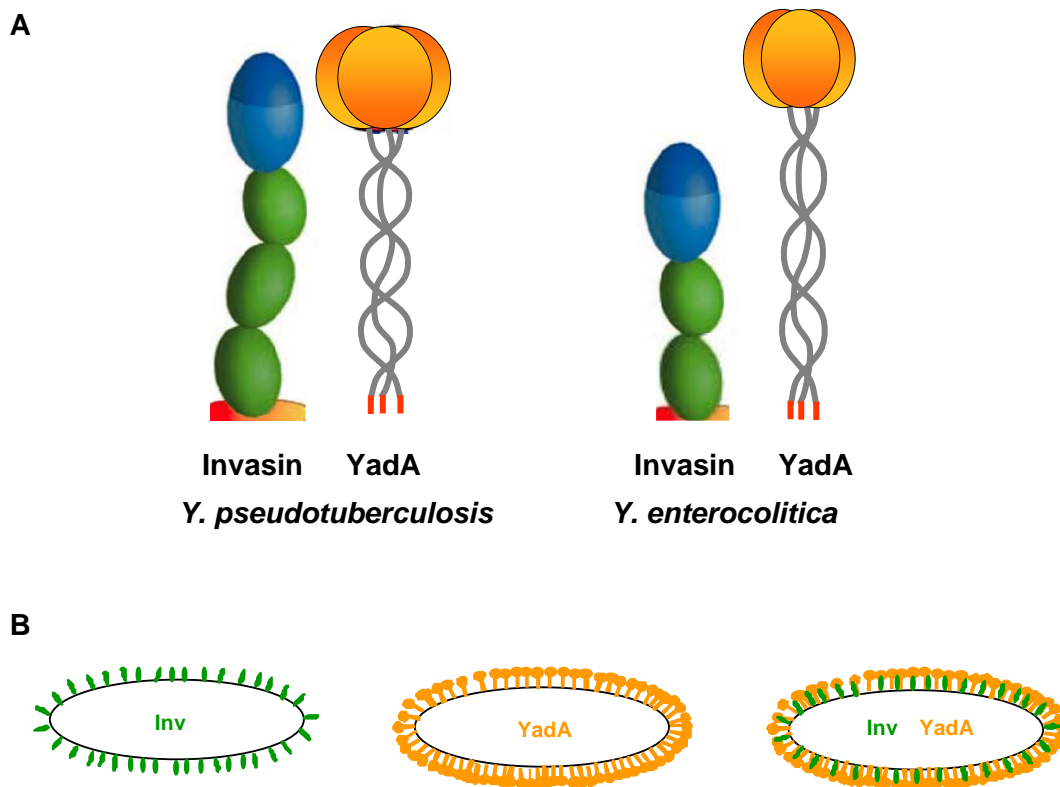


Abb. 4.10: Vereinfachte Illustration von YadA und Invasin aus *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. Schematische Darstellung der (A) YadA- und Invasin-Molekülstruktur mit den entsprechenden Größenverhältnissen in *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, (B) Situation bei jeweils einzeitigem und gleichzeitigem Vorhandensein der Proteine auf der bakteriellen Oberfläche.

Invasionsassays mit YadA- und Invasin-exprimierenden *E. coli* K-12 Stämmen zeigten, wie in Abbildung 4.11 dargestellt, zunächst die erwarteten Invasionsraten für die verschiedenen einzeln exprimierten YadA-Proteine. Invasin aus *Y. pseudotuberculosis* konnte insgesamt die stärkste Einwanderungsrate vermitteln. Im Gegensatz dazu ist Invasin aus *Y. enterocolitica* der deutlich schlechtere Invasionsfaktor und kann nur 30 % der Invasionsleistung des Proteins aus *Y. pseudotuberculosis* erbringen. Diese bereits beschriebene geringere Einwanderungsrate durch Invasin aus *Y. enterocolitica* kann auf einen strukturellen Unterschied zurückgeführt werden. $\text{Inv}_{p\text{stb}}$ ist durch das Vorhandensein einer Multimerisierungsdomäne dazu befähigt, durch multimeren Invasinmoleküle ein Clustering der Wirtszellrezeptoren hervorzurufen. Dadurch kommt es zu einer Verstärkung der die Aufnahme induzierenden Signaltransduktionskaskade (Dersch & Isberg, 1999). Diese Multimerisierungsdomäne fehlt in dem Inv_{ent} -Protein. Es ist in *Y. enterocolitica* dennoch der stärkste Internalisationsfaktor, da es eine dreifach höhere Invasion als YadA_{ent} bewirken kann.

Bei gleichzeitiger Expression von Invasin aus *Y. pseudotuberculosis* oder *Y. enterocolitica* und den YadA_{pstb}- bzw. YadA_{ent}-Proteinen in *E. coli* K-12 ist zumeist ein additiver Effekt zu beobachten. Die Invasionsraten erhöhten sich jeweils bei der gleichzeitigen Expression von YadA_{pstb} und Inv_{pstb} bzw. Inv_{ent}. Auch bei gleichzeitiger Expression von YadA_{ent} mit Inv_{ent} konnte die Einwanderungsrate gesteigert werden. Sie blieb jedoch weitgehend unverändert, wenn Inv_{pstb} mit YadA_{ent} bzw. YadA_{pstb}Δ53-83 gleichzeitig auf der bakteriellen Oberfläche exprimiert wurden.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die invasionsdefizienten YadA-Proteine die Invasin-vermittelte Invasion nicht beeinträchtigen. Die Expression der YadA-Proteine, die das Invasin auf der Bakterienoberfläche überragen, resultiert nicht in einer verminderten Aufnahme der Bakterien. Die Bindung von Invasin an die Wirtszellrezeptoren scheint demnach nicht gestört zu werden.

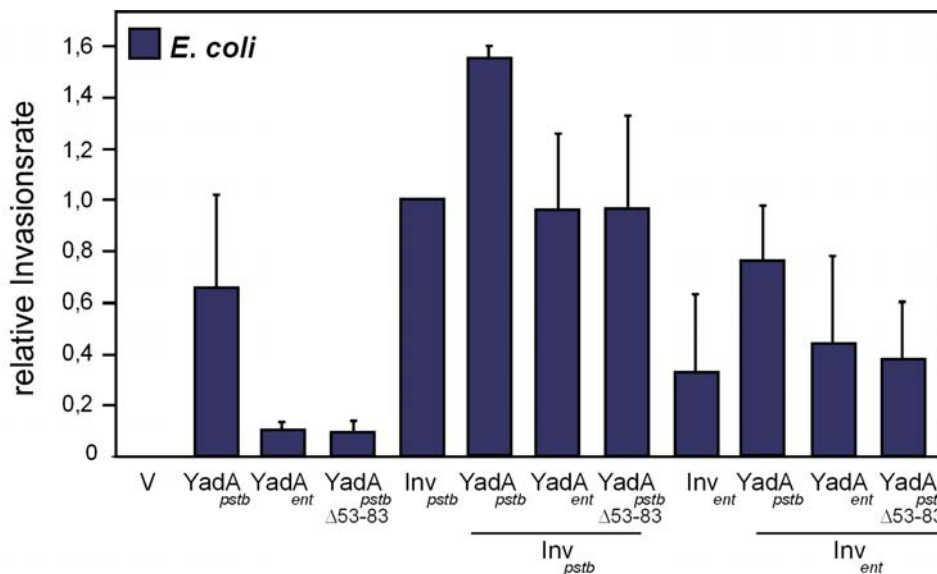


Abb. 4.11: Invasion bei gleichzeitiger Expression von YadA und Invasin aus *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. 5 x 10⁴ HEp-2 Zellen wurden mit 10⁶ Bakterien infiziert. Es wurden YadA- und/oder Invasin-exprimierende *E. coli* K-12 Stämme verwendet. Als Vektorkontrolle (V) wurde pBAD18 eingesetzt. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von drei unabhängigen Assays und ist in Relation zu der auf den Wert 1 festgesetzten YadA_{pstb}-vermittelten Adhäsion bzw. Invasion dargestellt.

4.8 Funktionelle Analysen zur Kollagenbindedomäne in YadA

4.8.1 Identifizierte Kollagenbindemotive in YadA_{ent}

Untersuchungen der letzten Jahre haben die Kollagenbindefähigkeit des YadA_{ent} Proteins verschiedenen Aminosäuremotiven innerhalb der Kopf- bzw. Nackenregion zugeordnet. Die Aminosäuren H156 und H159 (Roggenkamp *et al.*, 1995), die Aminosäureregion 83–104 (Tamm *et al.*, 1993) und sich wiederholende Aminosäuremotive der Folge NSVAIGXXS (Tahir *et al.*, 2000) wurden als essentiell für die Kollagenbindung identifiziert. Außerdem konnte durch weitere Deletionsanalysen gezeigt werden, dass sowohl die Kopf- als auch die Nackenregion des Proteins für die Kollagenbindung von Bedeutung sind (Roggenkamp *et al.*, 2003).

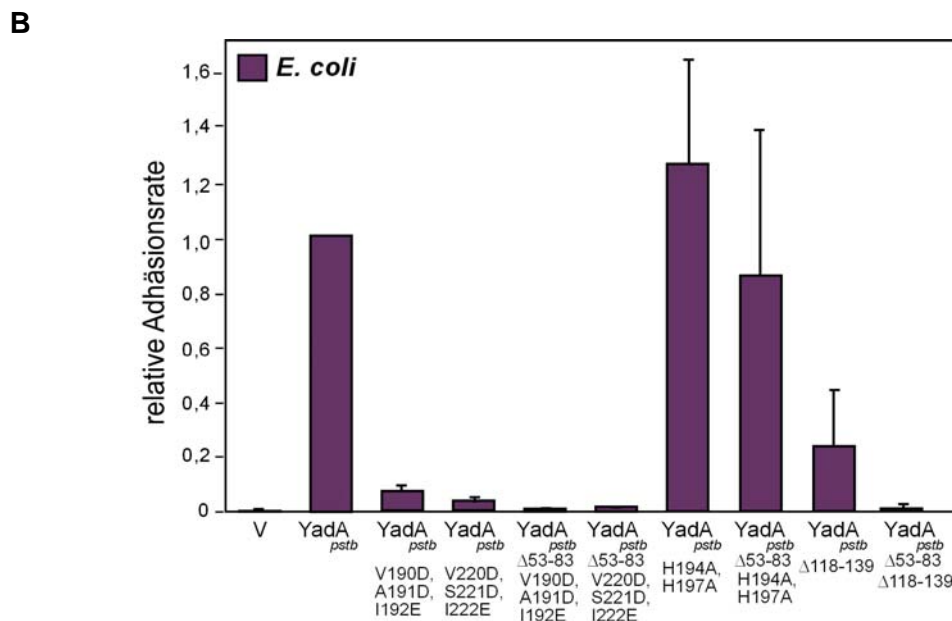
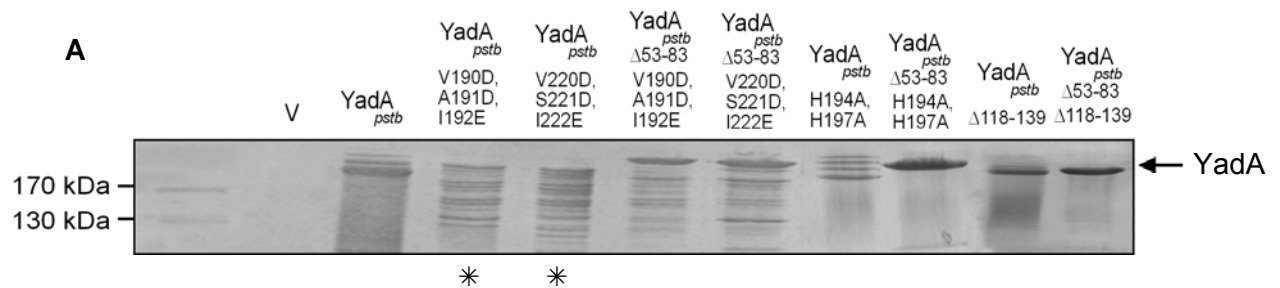
4.8.2 Analyse der Kollagenbindemotive in YadA_{pstb}

Um den Zusammenhang zwischen Invasion bzw. Adhäsion und der Bindung verschiedener Proteine der extrazellulären Matrix besser verstehen zu können, wurde die Kollagenbindung eingehender analysiert. In YadA_{pstb} und YadA_{pstb}Δ53-83 wurden die zu den in YadA_{ent} identifizierten Kollagenbindestellen äquivalenten Aminosäuren mutiert bzw. deletiert. Die resultierenden YadA-Mutanten YadA_{pstb}/Δ53-83 H194A, H197A, YadA_{pstb}/Δ53-83 V190D, A191D, I192E, YadA_{pstb}/Δ53-83 V220D, S221D, I222E und YadA_{pstb}/Δ53-83 Δ118-139 wurden in *E. coli* K-12 exprimiert.

Wie Präparationen der Außenmembran deutlich machen, wirkten sich die Mutationen nicht auf die Lokalisation der Proteine auf der bakteriellen Oberfläche aus (Abbildung 4.12 A). Im Fall der beiden mutierten NSVAIGXXS Motive (V190D, A191D, I192E und V220D, S221D, I222E) war jedoch eine geringere und teilweise destabilisierte YadA-Menge in der Außenmembran detektierbar. Diese Mutation beeinträchtigte sowohl bei YadA_{pstb} als auch YadA_{pstb}Δ53-83 die korrekte Trimerisierung und/oder Exposition des Proteins in der Außenmembran. Dementsprechend vermittelten alle YadA-Proteine mit den Mutationen des NSVAIGXXS Motivs weder Adhäsion noch Invasion in die humanen Wirtszellen (Abbildung 4.12 B und C). Diesem Ergebnis widersprechend, zeigten allerdings YadA_{pstb}V190D, A191D, I192E-exprimierende Bakterien eine stärkere Fähigkeit

an Kollagen zu binden als $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -exprimierende Bakterien (Abbildung 4.12 D). Auch die Daten von Tahir *et al.* (2000) hatten eine verminderte Kollagenbindung infolge der Mutation dieses Motivs erwarten lassen. Die aufgrund der Mutation beobachtete Störung der Oligomerisierung könnte demnach eher die Exposition hydrophober Regionen verursacht haben, die eine unspezifische Bindung an Kollagen zur Folge haben.

Die Einführung der Mutationen H194A, H197A hatte keinen negativen Einfluss auf die Adhäsion, Invasion oder Kollagenbindung in $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ und $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}$. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die beiden Histidine in $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ keine Bedeutung für die Kollagenbindung haben.



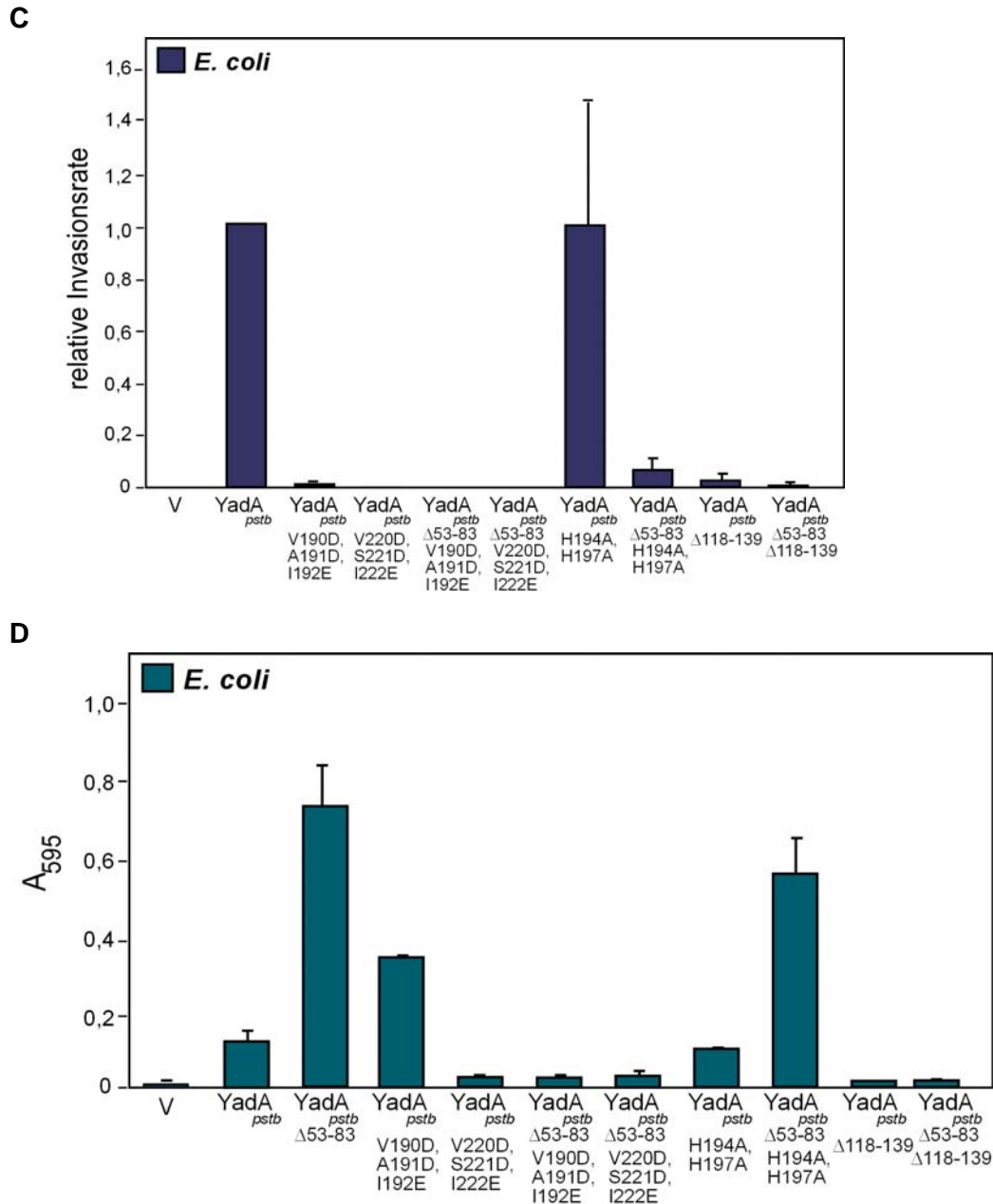


Abb. 4.12: Expression in der Außenmembran, Adhäsions- und Invasionseigenschaften und Kollagenbindefähigkeiten verschiedener YadA-Mutanten. Als Vektorkontrolle (V) wurde jeweils pBAD18 verwendet. **(A)** Westernblot-Analyse von Außenmembranpräparationen YadA-exprimierender *E. coli* K-12 Stämme. YadA wurde mit einem polyklonalen Antikörper detektiert. In den mit * gekennzeichneten Außenmembranpräparationen wurden geringere Menge an YadA nachgewiesen. **(B)** Adhäsions- und **(C)** Invasionsassays mit YadA-exprimierenden *E. coli* K-12 Stämmen. 5×10^4 HEp-2 Zellen wurden mit 10^6 Bakterien infiziert. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von drei unabhängigen Assays und ist in Relation zu der auf den Wert 1 festgesetzten $\text{YadA}_{\text{pstb}}$ -vermittelten Adhäsion bzw. Invasion dargestellt. **(D)** Plastik wurde über Nacht mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen Typ I beschichtet. Die Detektion daran gebundener YadA-exprimierender Bakterien erfolgte durch Anfärben mit Kristallviolett und Messen der Farbintensität.

Die Deletion der Aminosäuren 118-139 resultierte, wie von Roggenkamp *et al.* (1995) für YadA_{ent} beschrieben, sowohl in $\text{YadA}_{\text{pstb}}$ als auch in $\text{YadA}_{\text{pstb}}\Delta 53-83$ in einem Verlust der Kollagenbindung. Es handelt sich dabei jedoch nicht um einen

spezifischen Effekt, da damit gleichzeitig auch der Verlust der YadA_{pstb} -vermittelten Adhäsion und Invasion verbunden ist (Abbildung 4.12 B und C). Die Fähigkeit von YadA_{pstb} , an Fibronektin zu binden, sollte sowohl die Bindung als auch Einwanderung in HEP-2 Zellen weiterhin gewährleisten, zumal die Analysen mit Kollagenantikörpern keinen negativen Effekt auf die YadA_{pstb} -vermittelte Invasion gezeigt hatten. Für die Deletion der 22 Aminosäuren kann daher davon ausgegangen werden, dass die Mutation größere Konformationsänderungen innerhalb des Proteins verursacht, die einen nahezu vollständigen Funktionsverlust bedingen, auch wenn die Trimerisierung nicht gestört scheint. Abschließend konnte für keine der in YadA_{ent} identifizierten Kollagenbindestellen ein spezifischer Effekt in YadA_{pstb} nachgewiesen werden. Der überwiegende Teil der Veränderungen der Aminosäuren hatte funktionsstörende Auswirkungen auf die Konformation des YadA-Proteins.

4.8.3 Identifikation von für die Kollagenbindung essentiellen Aminosäuren in YadA_{pstb}

2004 kristallisierten Nummelin *et al.* eine aus der Kopf- und Nackendomäne bestehende, rekombinante Kollagenbindedomäne von YadA_{ent} . Die trimere Kollagenbindedomäne wurde als neunfach gewundene, linkshändige, parallele β -Rolle beschrieben. Diese Quartärstruktur des YadA-Proteins wurde als bedeutend für die Kollagenbindung erkannt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die zuvor für die Kollagenbindung als essentiell identifizierten Aminosäuren der NSVAIG-Motive vielmehr eine strukturelle Funktion ausüben. Sie bilden den inneren hydrophoben Kern des Trimers. Die weitere Mutagenese von oberflächenexponierten Aminosäuren ermöglichte die Identifikation einer putativen „Kollagen-bindenden Oberfläche“ des YadA_{ent} -Proteins, bei der mehrere Aminosäuren an der Kollagenbindung beteiligt sind. Eine besonders drastische Reduktion der Kollagenbindeaffinität konnte bei dem Austausch V98D, N99A beobachtet werden. Um die Bedeutung der äquivalenten Aminosäuren in YadA_{pstb} bzw. $\text{YadA}_{pstb}\Delta 53-83$ zu untersuchen, wurden diese Aminosäuren ebenfalls mutiert und zunächst die Oligomerisierung der Proteine in Außenmembranpräparationen analysiert.

Die vorgenommenen Austausche hatten keinen negativen Effekt auf die Trimerisierung oder Oberflächenexposition der Proteine, wie die Präparation der

Außenmembranproteine zeigt (Abbildung 4.13 A). Die Analyse der Binde- und Einwanderungsfähigkeit ergab keinen Unterschied in den Adhäsions- und Invasioneigenschaften des $\text{YadA}_{p_{stb}}\text{V133D}$, N134A-Proteins im Vergleich zu denen des Wildtypproteins (Abbildung 4.13 B). Demgegenüber führte der Austausch der Aminosäuren in $\text{YadA}_{p_{stb}}\Delta 53-83$ zu einer um ca. 80 % reduzierten Adhäsion an eukaryotische Zellen. Damit verbunden konnte ein völliger Verlust der Invasionsfähigkeit beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten auf einen Effekt der Mutation auf die Bindeeigenschaften an Proteine der extrazellulären Matrix hin.

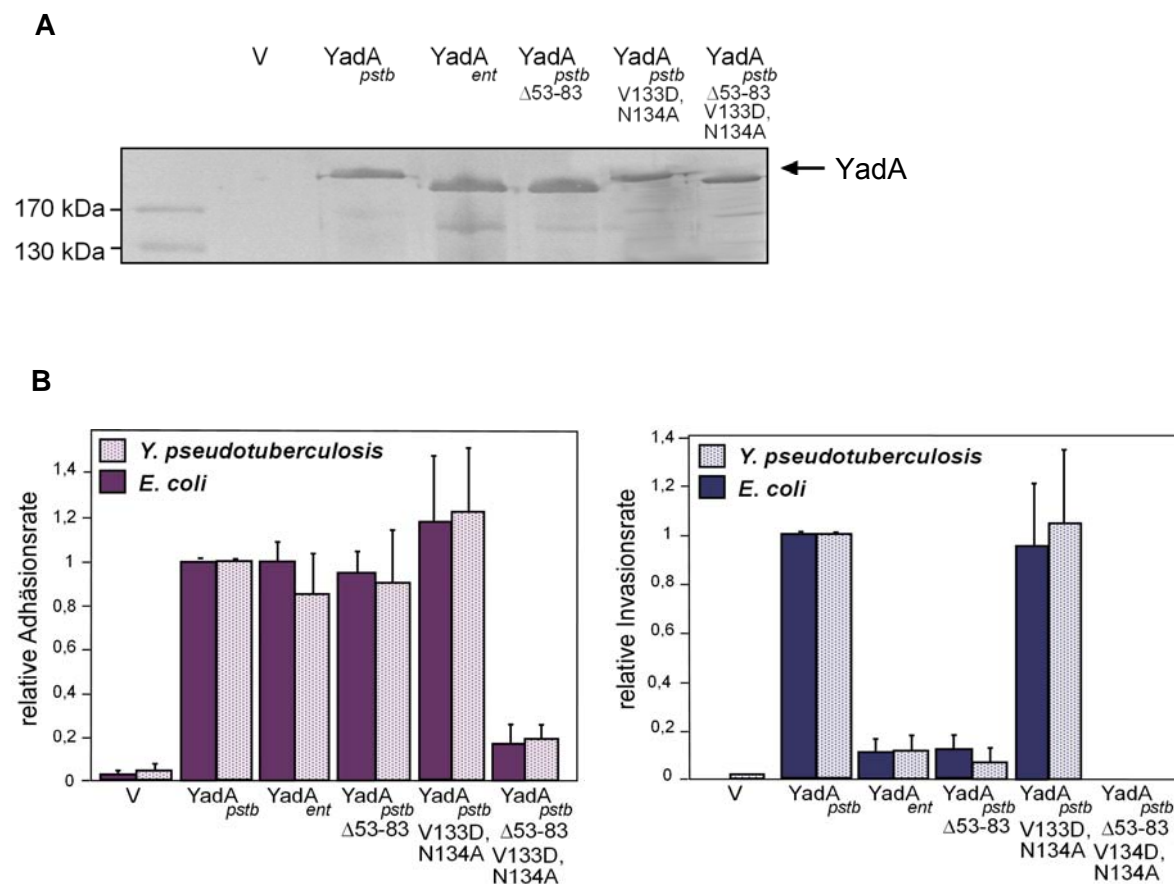


Abb. 4.13: Expression in der Außenmembran und Adhäsions- und Invasioneigenschaften der YadA -Mutanten V133D, N134A. Als Vektorkontrolle (V) wurde jeweils pBAD18 verwendet. **(A)** Westernblot-Analyse von Außenmembranpräparationen YadA -exprimierender *Y. pseudotuberculosis* YP31 Stämme. YadA wurde mit einem polyklonalen Antikörper detektiert. **(B)** Adhäsions- und Invasionsassays mit YadA -exprimierenden *E. coli*- und *Y. pseudotuberculosis*-Stämmen. 5×10^4 HEp-2 Zellen wurden mit 10^6 Bakterien infiziert. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert von drei unabhängigen Assays und ist in Relation zu der auf den Wert 1 festgesetzten $\text{YadA}_{p_{stb}}$ -vermittelten Adhäsion bzw. Invasion dargestellt.

Sich anschließende Studien zur EZM-Bindfähigkeit der Mutanten zeigten sowohl für $\text{YadA}_{p_{stb}}\text{V133D}$, N134A als auch für $\text{YadA}_{p_{stb}}\Delta 53-83 \text{ V133D}$, N134A eine starke Abnahme der Kollagenbindefähigkeit (Abbildung 4.14). Nur eine sehr

geringe Anzahl YadA-exprimierender Bakterien konnte an Kollagen binden. Den Aminosäuren V133 und N134 kann somit auch in $\text{YadA}_{p_{stb}}$ eine essentielle Bedeutung für die Kollagenbindung zugeordnet werden. Darüber hinaus bestätigen die Ergebnisse, dass die $\text{YadA}_{p_{stb}}$ -vermittelte Invasion unabhängig von der Kollagenbindung erfolgt.

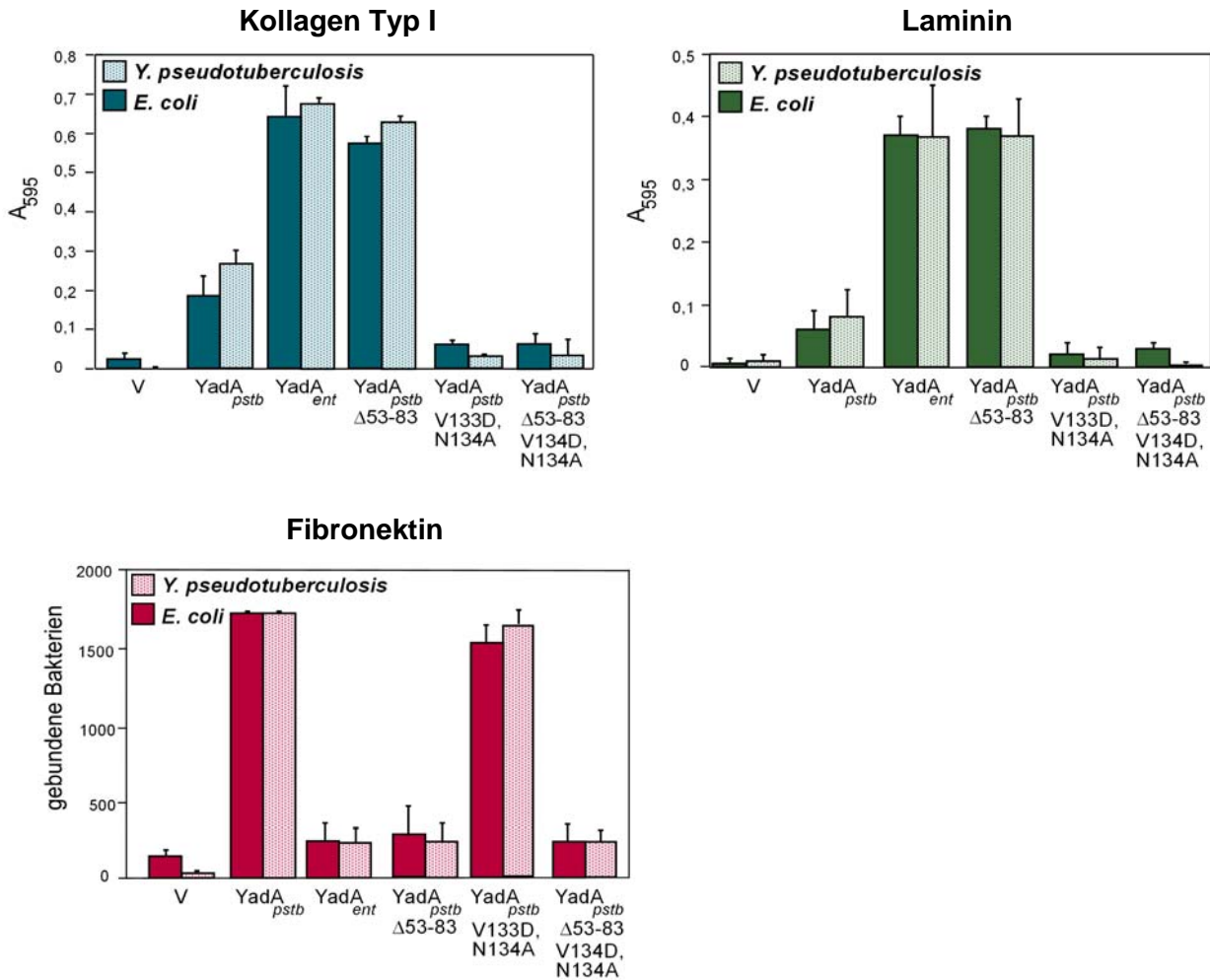


Abb. 4.14: EZM-Bindeeigenschaften der YadA-Mutanten V133D, N134A. 10 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen, Laminin und Fibronectin wurden benutzt, um Plastik oder Glas zu beschichten. Die Detektion daran gebundener YadA-exprimierender Bakterien erfolgte entweder durch Anfärben mit Kristallviolett und Detektion der Farbintensität bei 595 nm oder durch Auszählen fibronectin-gebundener Bakterien bei mikroskopischer Betrachtung. Als Vektorkontrolle (V) wurde pBAD18 verwendet.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich der Austausch der Aminosäuren V133 und N134 in $\text{YadA}_{p_{stb}}$ und in $\text{YadA}_{p_{stb}} \Delta 53-83$ auch auf die Bindeeigenschaften an Laminin auswirkt (Abbildung 4.14). Die Bindung von $\text{YadA}_{p_{stb}} \text{V133D, N134A}$ - und $\text{YadA}_{p_{stb}} \Delta 53-83 \text{V133D, N134A}$ -exprimierenden Bakterien an dieses EZM-Molekül war ebenfalls stark reduziert. Im Gegensatz dazu blieb die Fähigkeit der mutierten YadA-Proteine an Fibronectin zu adhären unbeeinflusst. Somit

lässt dieses Experiment den Schluss zu, dass die Binderegionen für die EZM-Moleküle Kollagen und Laminin gemeinsam, aber getrennt von der für Fibronectin, lokalisiert sind.

4.9 Charakterisierung der Funktion der YadA-Kopfdomäne

Durch die Identifikation der Aminosäureregion, die für die YadA_{pstb}-vermittelte Invasion essentiell ist, konnte die Bedeutung der Kopfdomäne für die Interaktion mit der Wirtszelle verdeutlicht werden. Um aufzuklären, ob diese Domäne allein in der Lage ist Internalisation auszulösen, sollten YadA-Kopf-Derivate überproduziert, an Latexkugeln gekoppelt und in funktionellen Assays eingesetzt werden. Vergleichende Analysen mit einem YadA_{pstb}Δ53-83- Proteinderivat sollten hierbei weiteren Aufschluss über die invasionsspezifische Domäne geben. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwiefern die löslichen YadA-Kopf-Derivate die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden in der Wirtszelle vermitteln und somit für die Analyse der Unterschiede der Signaltransduktionsvorgänge bei Adhäsion und Invasion geeignet sind.

4.9.1 Überexpression der YadA-Kopfdomäne

Der von Nummelin *et al.* (2004) kristallisierte Aminosäurebereich des YadA Proteins aus *Y. enterocolitica* ist in Abbildung 4.15 dargestellt.

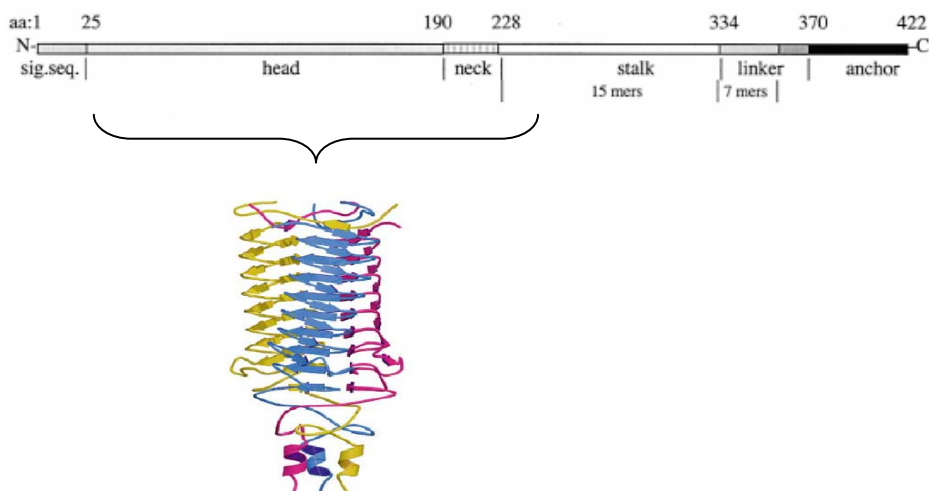
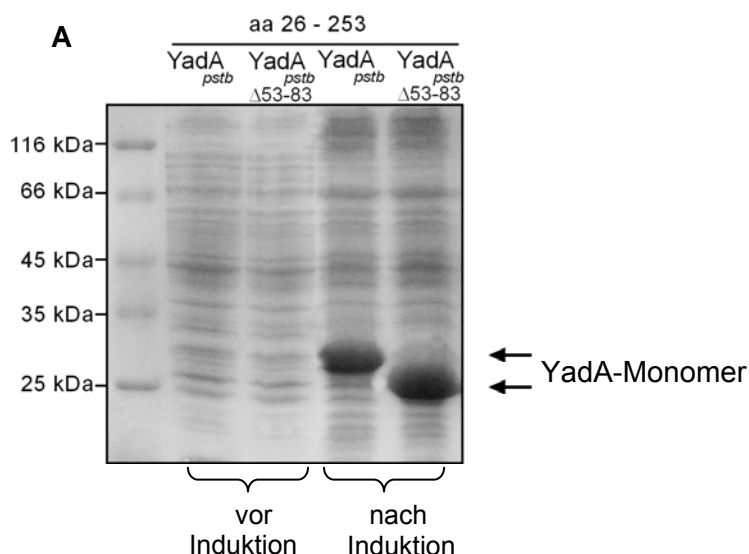


Abb. 4.15: Kennzeichnung und Darstellung der kristallisierten YadA-Kopfdomäne. Die den Kopf und Nacken bildenden Aminosäuren 26–241 des YadA_{ent}-Proteins wurden von Nummelin *et al.* (2004) kristallisiert. Die trimere Struktur der Kollagenbindedomäne wird von einer neunfach gewundenen, linkshändigen, parallelen β-Rolle gebildet.

Da die YadA_{ent} Kopf- und Nackenregion (aa 26-241) erfolgreich als Trimer überexprimiert und gereinigt wurde, könnte auch die Überexpression der entsprechenden Aminosäureregion aus YadA_{pstb} ein trimeres, lösliches YadA-Proteinderivat ergeben. Aufgrund ihrer Bedeutung für die Funktionalität des Proteins ist die korrekte Trimerisierung eine Voraussetzung für weitere Analysen hinsichtlich der Binde- und Einwanderungskapazitäten.

Die Aminosäuren 26-253 des YadA_{pstb} - bzw. $\text{YadA}_{pstb}\Delta 53-83$ -Proteins wurden zunächst so in einen Überexpressionsvektor (pET28a) kloniert, dass bei einer Induktion der Überexpression YadA-Kopf-Derivate mit einem N-terminalen 6 x His-Tag synthetisiert werden. Somit konnte im Anschluss eine native Aufreinigung mittels Affinitätschromatografie durchgeführt werden.

Abbildung 4.16 zeigt die YadA-Kopf-Derivate nach der Überexpression (A) und Aufreinigung (B) in einer denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die Trimere des gesamten YadA-Proteins können durch die denaturierenden Eigenschaften des SDS nicht effizient in Monomere überführt werden (siehe Kapitel 4.2). Bei der Überexpression der verkürzten 6x His-getaggten YadA-Kopf-Derivate wurde allerdings überwiegend monomeres Protein (ca. 27 bzw. 22 kDa) detektiert. Nach der affinitätschromatografischen Reinigung konnten jedoch in einer geringen Konzentration auch YadA-Trimere (ca. 80 bzw. 66 kDa) detektiert werden. Demnach könnten die gereinigten YadA-Kopf-Derivate entweder hauptsächlich als Monomere vorliegen oder als Trimere, die sich durch die Zugabe von SDS in ihre monomere Struktur trennen lassen.



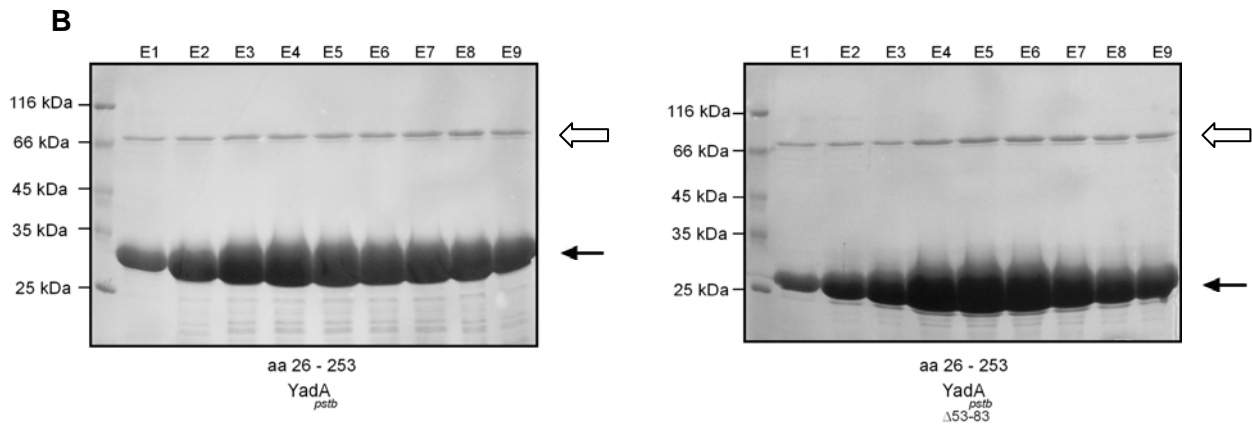
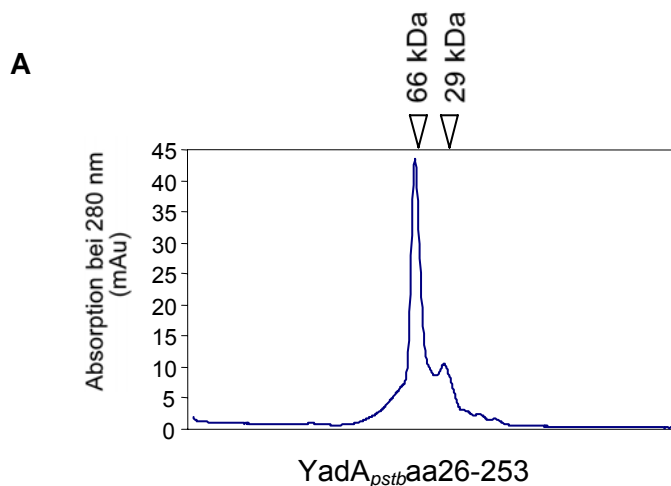


Abb. 4.16: Überexpression und Reinigung der YadA-Kopf-Derivate. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (15 %ige Gele). **(A)** Überexpression der unter die Kontrolle des T7-Promotors klonierten *yadA*-Fragmente vor und 2 h nach Induktion mit 2 mM IPTG. **(B)** Native Reinigung der YadA-Kopf-Derivate mittels Affinitätschromatografie. Die gezeigten Fraktionen (E1-E9) wurden mit 250 mM Imidazol eluiert. Pfeile weisen auf das Monomer (→) und das Trimer (⇐) des YadA_{pstb}aa26-253- und des YadA_{pstb}Δ53-83 aa26-253-Proteins hin.

4.9.2 Analyse des Oligomerisierungszustandes der YadA-Kopf-Derivate

Um zu klären, ob die YadA-Kopf-Derivate in Lösung hauptsächlich als Monomere oder als Trimere vorliegen, wurde der Oligomerisierungszustand der YadA-Proteinderivate mittels analytischer Größenausschlusschromatografie charakterisiert. Gereinigte und dialysierte YadA-Kopf-Derivate wurden mit einer Superdex 200 HR Säule aufgetrennt.

Wie in Abbildung 4.17 zu erkennen ist, zeigte sich je ein dominantes Absorptionsmaximum, das auf ein Molekulargewicht von über 66 kDa für YadA_{pstb}aa26-253 bzw. nahezu 66 kDa für YadA_{pstb}Δ53-83 aa26-253 schließen lässt. Dies entspricht den Größen der trimeren YadA-Proteinderivate.



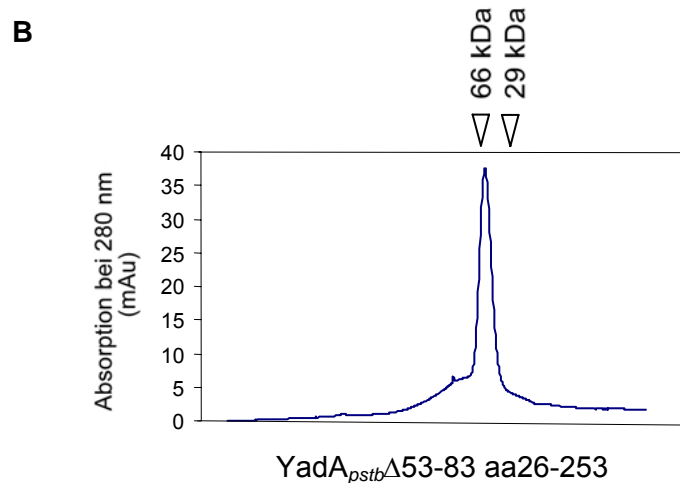


Abb. 4.17: Analytische Größenausschlusschromatografie der YadA-Kopf-Derivate. Gereinigte YadA-Kopf-Derivate wurden über eine Superdex 200 HR 10/30 Säule aufgetrennt und das Elutionsprofil bei 280 nm Absorption dargestellt. Die separat aufgetrennten Molekulargewichtstandards (BSA, 66 kDa und Carbonic Anhydrase, 29 kDa) sind entsprechend ihrem Elutionsprofil mit Pfeilen gekennzeichnet.

Unter nativen Bedingungen liegen daher beide Kopfdomänen fast ausschließlich in der trimeren Form vor, so dass die Voraussetzungen für weitergehende funktionelle Analysen mit den YadA-Proteinderivaten gegeben sind.

4.9.3 Beschichtung von Latexkugeln mit gereinigten YadA-Kopf-Derivaten

Für das Invasin-Protein konnte eine für die Invasion essentielle Aminosäure identifiziert werden, indem verschiedene Invasin-Proteinderivate überproduziert, gereinigt, an Latexkugeln gekoppelt und in Invasionsassays eingesetzt wurden (Dersch & Isberg, 1999). Die Kopplung basiert auf passiver Adsorption und bietet die Möglichkeit, die durch Proteinderivate vermittelte Einwanderung in Zellen oder Bindung an EZM-Moleküle durch mikroskopische Detektion der Latexkugeln (Durchmesser 1,1 μM) analysieren zu können.

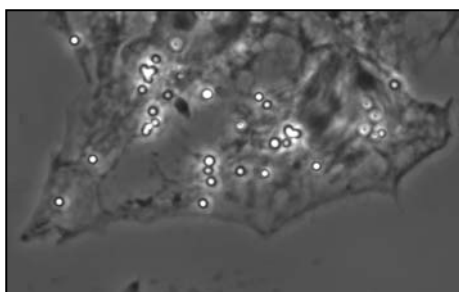
Verschiedene Konzentrationen (0,1–1 mg/ml) der YadA-Kopf-Derivate wurden an Latexkugeln gekoppelt und die erfolgreiche Beschichtung durch Immunoblotanalysen sowie durch die Bestimmung der Proteinkonzentration vor und nach der Beschichtung nachgewiesen. Die mit den beiden YadA-Kopf-Derivaten beschichteten Latexkugeln wurden nachfolgend in funktionellen Analysen eingesetzt, um die Rolle der Aminosäureregion 26-253 des YadA-Proteins näher zu untersuchen.

4.9.3.1 Analyse der von YadA-Kopf-Derivaten-vermittelten Adhäsion und Invasion in eukaryotische Zellen

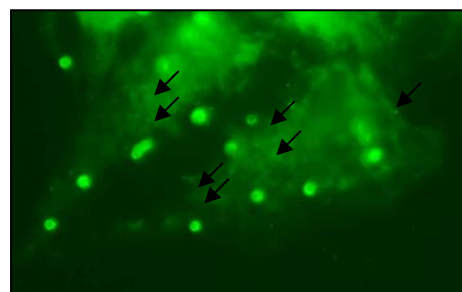
Zur Bestimmung der adhäsiven und invasiven Eigenschaften der YadA-Proteinderivate wurden HEp-2 Zellen mit YadA_{pstb}aa26-253- bzw. YadA_{pstb}Δ53-83 aa26-253-beschichteten Latexkugeln für 2 h bei 37°C inkubiert. Extra- und intrazelluläre Latexkugeln wurden durch Immunfluoreszenzmikroskopie identifiziert und quantifiziert. Hierfür wurden nach der Adhäsions- und Internalisationszeit zunächst die Zellen auf den Glasplättchen fixiert. Im Anschluss wurden sie mit einem gegen YadA gerichteten Antikörper und einem sekundären FITC-gekoppelten Antikörper behandelt. Bei mikroskopischer Betrachtung sind im Phasenkontrast sowohl die gebundenen als auch die internalisierten Latexkugeln zu erkennen. Demgegenüber sind bei der Fluoreszenzmikroskopie allerdings nur diejenigen Latexkugeln sichtbar, die sich außerhalb der Zellen befinden und daher von den Antikörpern detektiert werden können.

Kontroll-Latexkugeln, die mit BSA beschichtet worden waren, zeigten keine oder nur sehr geringe Bindung an die eukaryotischen Zellen (Daten nicht gezeigt). Beide YadA-Kopf-Derivate vermitteln dagegen eine starke Adhärenz an HEp-2 Zellen (siehe Abbildung 4.18 A-C). Während die mit YadA_{pstb}aa26-253 beschichteten Latexkugeln auch innerhalb der Zellen detektiert werden konnten, wurden nur vereinzelte mit YadA_{pstb}Δ53-83 aa26-253 beschichtete Latexkugeln internalisiert. Die YadA_{pstb}-Domäne der Aminosäuren 26-253 ist daher ausreichend, um eine Internalisation in Wirtszellen zu vermitteln.

A

YadA_{pstb}aa26-253

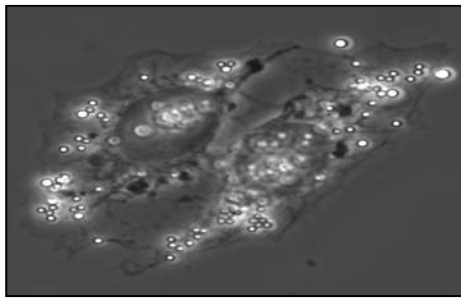
Phasenkontrast



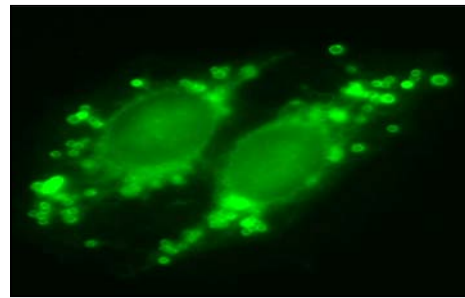
Fluoreszenz

B

YadA_{pstb}Δ53-83 aa26-253



Phasenkontrast



Fluoreszenz

C

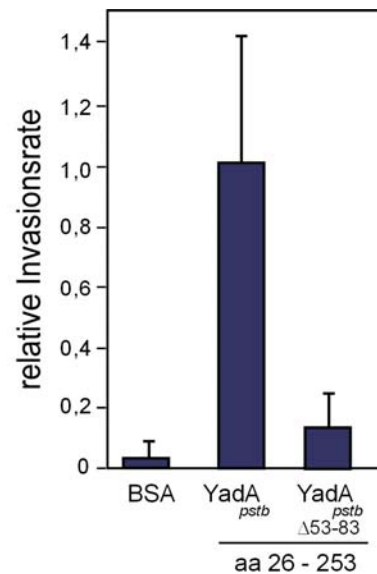
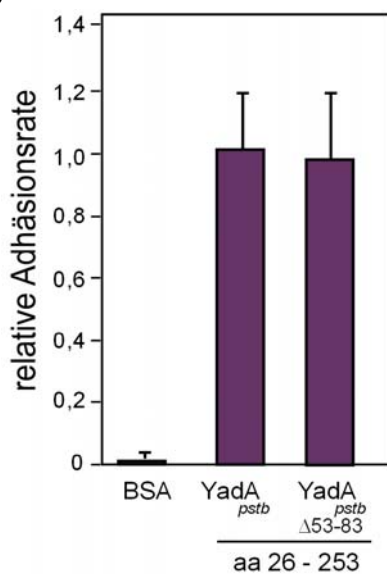


Abb. 4.18: Internalisierung der mit YadA-Kopf-Derivaten beschichteten Latexkugeln in HEp-2 Zellen. 10^7 beschichtete Latexkugeln wurden zu 10^5 HEp-2 Zellen gegeben, die auf Glasplättchen ausgesät wurden. Bindung und Aufnahme der Latexkugeln wurden (**A und B**) mikroskopisch detektiert und (**C**) durch Auszählen der internalisierten Latexkugeln quantifiziert. Mit BSA beschichtete Latexkugeln wurden als Kontrolle verwendet. Internalisierte Latexkugeln sind exemplarisch durch Pfeile gekennzeichnet.

4.9.3.2 Analyse der Bindekapazitäten der YadA-Kopf-Derivate an Kollagen und Fibronektin

Um das Bindevermögen der YadA-Kopf-Derivate an Moleküle der extrazellulären Matrix zu untersuchen, wurden YadA_{pstb}aa26-253- bzw. YadA_{pstb}Δ53-83 aa26-253-beschichtete Latexkugeln in einem Kollagen- und Fibronektinbindeassay eingesetzt.

Wie in Abbildung 4.19 deutlich wird, konnten mit beiden YadA-Kopf-Derivaten beschichtete Latexkugeln an Kollagen binden. Dabei zeigten sich für die

verkürzten YadA-Kopf-Derivate dieselben Bindeeigenschaften, die zuvor bei der Expression der Gesamtproteine in Bakterien beobachtet wurden: $\text{YadA}_{p\text{stb}}\text{aa}26\text{-}253$ bindet deutlich schwächer an Kollagen, während $\text{YadA}_{p\text{stb}}\Delta 53\text{-}83 \text{ aa}26\text{-}253$ eine starke Bindung zeigt. Für die $\text{YadA}_{p\text{stb}}\text{aa}26\text{-}253$ -Proteinderivate konnte außerdem eine starke Bindefähigkeit an Fibronectin nachgewiesen werden. Demgegenüber konnte nur eine geringe Anzahl von mit $\text{YadA}_{p\text{stb}}\Delta 53\text{-}83 \text{ aa}26\text{-}253$ beschichteten Latexkugeln detektiert werden, die an Fibronectin gebunden hatten.

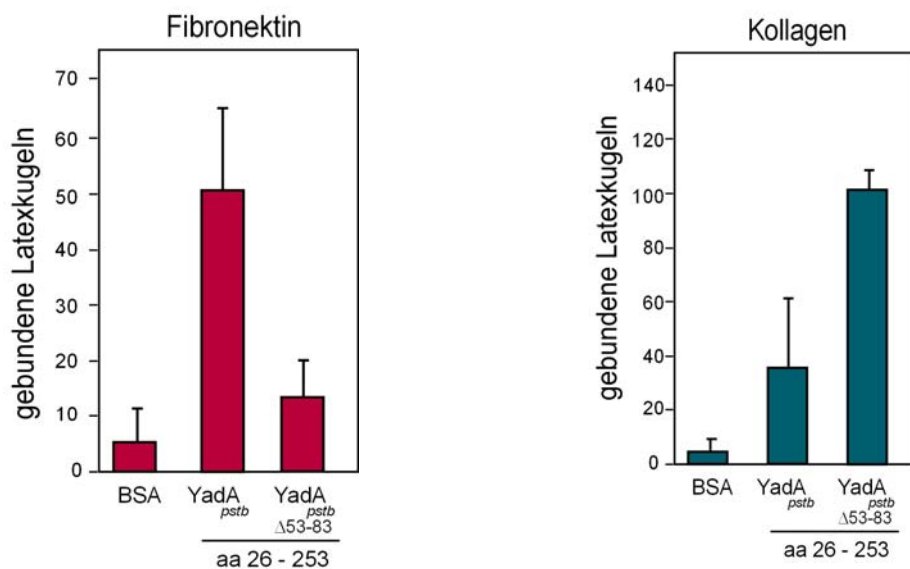


Abb. 4.19: Bindevermögen der mit YadA-Kopf-Derivaten beschichteten Latexkugeln an Kollagen und Fibronectin. 10^7 mit $\text{YadA}_{p\text{stb}}\text{aa}26\text{-}253$ bzw. $\text{YadA}_{p\text{stb}}\Delta 53\text{-}83 \text{ aa}26\text{-}253$ beschichtete Latexkugeln wurden in einem Kollagen- bzw. Fibronectinbindeassay eingesetzt. Mit BSA beschichtete Latexkugeln wurden als Kontrolle verwendet. Glasplättchen wurden über Nacht mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen bzw. Fibronectin beschichtet. Gebundene Latexkugeln wurden durch Auszählen bei mikroskopischer Betrachtung detektiert.

Da die Kollagen- und Fibronectinbindeeigenschaften der Kopf- und Nackenregion identisch zu denen der Gesamtproteine sind, kann die Domäne der Aminosäuren 26-253 als ausreichend sowohl für die Kollagen- als auch die Fibronectinbindung identifiziert werden.

4.9.4 Analyse der durch YadA-Kopf-Derivate induzierten Signaltransduktion

Neben der Identifikation funktioneller YadA-Domänen ist die Analyse der induzierten Signaltransduktion in der Wirtszelle von besonderem Interesse. Dabei sind vor allem Unterschiede in der Signalkaskade, die bei der YadA-vermittelten

Adhäsion bzw. Invasion ausgelöst werden, von Bedeutung, um Informationen über internalisationsspezifische Signalvorgänge zu erhalten. Zur Analyse verschiedener, während des $\text{YadA}_{p_{stb}}$ -vermittelten Invasionsprozesses aktivierter Kinasen wurden bislang die eukaryotischen Zellen mit YadA -exprimierenden Bakterien infiziert. Nach definierten Zeitpunkten werden die Zellen lysiert und verschiedene Moleküle der Signaltransduktionskaskade hinsichtlich ihres Phosphorylierungsstatus durch Immunoblotanalysen untersucht. Wäre es demgegenüber möglich, die Signaltransduktionskaskade durch die Infektion mit löslichem Protein zu induzieren, hätte dies den Vorteil, unabhängig vom Proteinexpressionsmuster der Bakterienzellen zu sein und letztlich durch den Einsatz von höheren Proteinkonzentrationen stärkere und leichter detektierbare Signale zu erhalten. Darüber hinaus könnte der Einfluss anderer bakterieller Faktoren eindeutig ausgeschlossen werden. Um zu bestimmen, inwiefern die Infektion von HEp-2 Zellen mit löslichem $\text{YadA}_{p_{stb}\text{aa}26-253}$ - und $\text{YadA}_{p_{stb}\Delta 53-83}\text{aa}26-253$ -Protein zu einer Phosphorylierung von Signalmolekülen führt, wurde zunächst die Fokale Adhäsions Kinase (FAK) untersucht. Die FAK ist mit der zytoplasmatischen Kette der β_1 -Integrin-Rezeptoren assoziiert und wird als Antwort auf Integrin-vermittelte Signalprozesse an der Position Y397 autophosphoryliert (Parsons, 2003). Sie ist eines der ersten Moleküle, die bei der $\text{YadA}_{p_{stb}}$ -vermittelten Invasion aktiviert werden (Eitel *et al.*, 2005; Hudson *et al.*, 2005).

Wie in dem Aktivierungsmuster der Abbildung 4.20 B zu sehen ist, führt die Infektion eukaryotischer Zellen mit löslichem $\text{YadA}_{p_{stb}\text{aa}26-253}$ - oder $\text{YadA}_{p_{stb}\Delta 53-83}\text{aa}26-253$ -Protein zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung der FAK. Die Detektion der unphosphorylierten Form der FAK zeigte, dass diese zu allen Untersuchungszeitpunkten in gleicher Menge vorlag und die Zunahme des phosphorylierten Moleküls daher nicht auf eine gesteigerte Proteinproduktion in der Zelle zurückzuführen ist. Ein Kontrollansatz in Form einer Infektion mit BSA zeigte keinerlei Aktivierung, so dass ein unspezifischer Effekt durch die Proteinzugabe auf die intrazelluläre Signaltransduktion ausgeschlossen werden kann. Der zeitliche Verlauf mit einer maximalen Phosphorylierung der FAK nach 10 bis 30 Minuten bei einer Infektion mit dem $\text{YadA}_{p_{stb}\text{aa}26-253}$ -Proteinderivat entspricht in etwa dem Verlauf, der bei einer Infektion mit $\text{YadA}_{p_{stb}}$ -exprimierenden Bakterien beobachtet werden konnte (Eitel *et al.*, 2005).

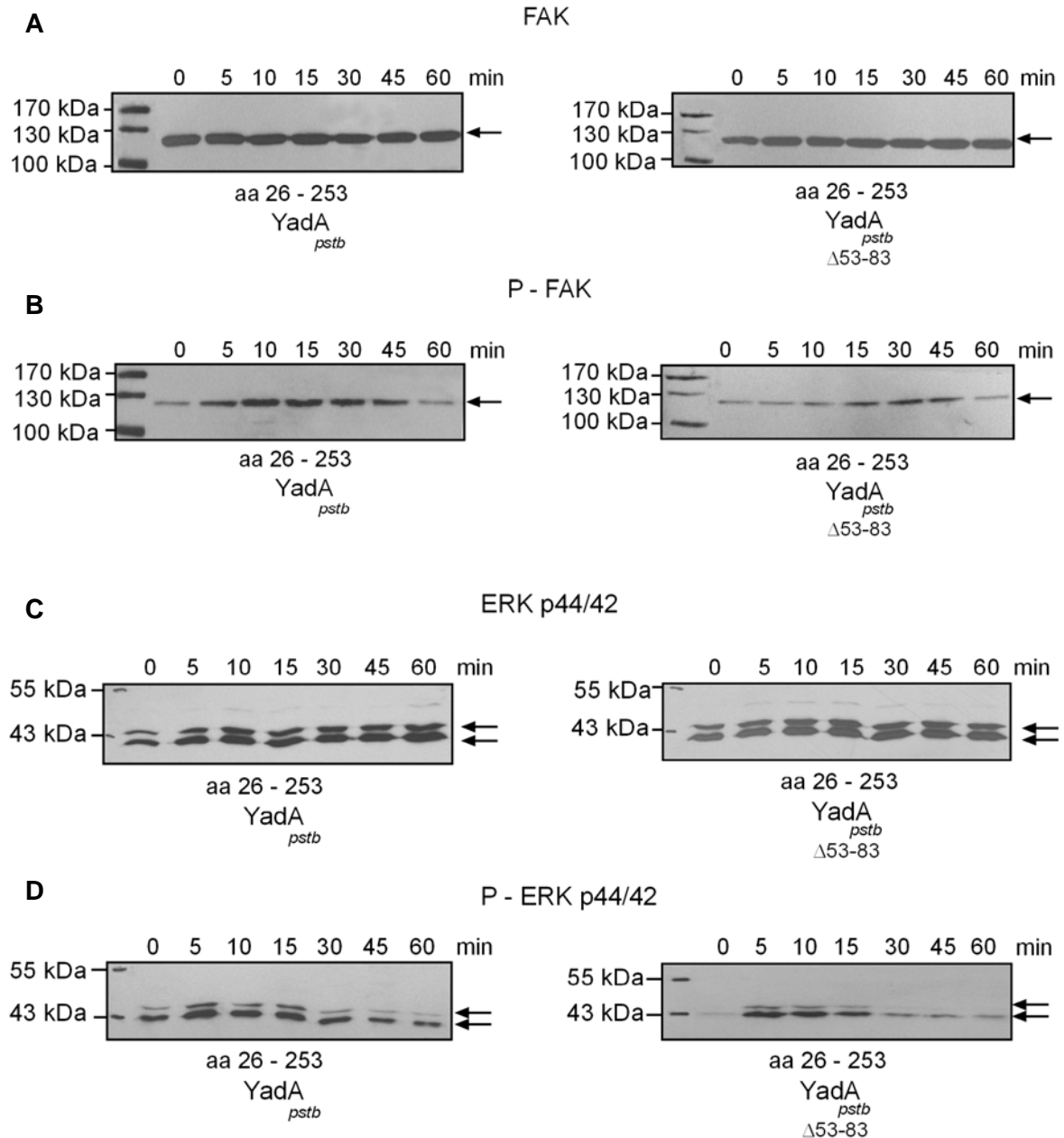


Abb. 4.20: Zeitabhängige Phosphorylierung der FAK und der p44/42 Kinasen. HEP-2 Zellen wurden mit 10 µg/ml *YadA_{pstb}* aa26-253- bzw. *YadA_{pstb}Δ53-83* aa26-253-Protein infiziert. Die Zellen wurden zu definierten Zeitpunkten (0, 10, 15, 30, 45, 60 min) mit 1x SDS-Probenpuffer lysiert. Die FAK-Proteine wurden mittels Immunoblot und dem Anti-P-FAK-Antikörper (Calbiochem) **(A)** bzw. Anti-FAK-Antikörper (Oncogene) **(B)** analysiert. Sowohl die phosphorylierten **(C)** als auch die unphosphorylierten **(D)** Formen der p44/42 Kinasen wurde mit Antikörpern von New England Biolabs nachgewiesen. Pfeile weisen auf die detektieren Signalmoleküle hin.

Weitere Signalmoleküle, die bei einer Infektion von eukaryotischen Zellen mit *YadA_{pstb}*-exprimierenden Bakterien nach kurzer Zeit aktiviert werden, sind die p44/42 Kinasen. Sie gehören zu den ERK Kinasen. Wie vorangegangene Experimente mit ERK Kinase Inhibitoren zeigten, sind diese zwar nicht an der Invasion

beteiligt, ihre Aktivierung ist aber für die $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -induzierte Synthese und Sekretion des Zytokins IL-8 essentiell (Eitel *et al.*, 2005).

Wie in Abbildung 4.20 D deutlich zu erkennen ist, werden auch die p44/42 Kinasen bei der Infektion von HEp-2 Zellen mit den löslichen YadA-Protein-derivaten aktiviert. Der Zeitpunkt der maximalen Phosphorylierung im Fall des Wildtypproteinderivats entspricht dem bei einer Infektion mit $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -exprimierenden Bakterien.

Untersuchungen zur YadA-induzierten Signaltransduktion in Wirtszellen sind demnach sehr gut durch den Einsatz von gereinigten YadA-Kopf-Derivaten möglich. Dies könnte weiterführende Analysen zur Identifikation invasions-spezifischer Signaltransduktionswege in Zukunft deutlich vereinfachen.

Bei der Infektion mit $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83 \text{ aa}26-253}$ konnte, im Vergleich zur der Infektion mit $\text{YadA}_{p\text{stb}\text{aa}26-253}$, für die beiden analysierten Proteine der intrazellulären Signaltransduktionskaskade jeweils eine etwas schwächere Phosphorylierung beobachtet werden. Bezüglich der FAK könnte dies auf einen ersten Unterschied in den intrazellulär ausgelösten Signalen als Folge der $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83 \text{ aa}26-253}$ vermittelten Adhäsion bzw. der $\text{YadA}_{p\text{stb}\text{aa}26-253}$ induzierten Invasion hindeuten. Darüber hinaus verdeutlicht dieses Ergebnis, dass die Phosphorylierung der FAK unabhängig von der Invasion erfolgt.

Da die Aktivierung der ERK p44/42 Kinasen durch $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83 \text{ aa}26-253}$, verglichen mit der durch das Wildtyp-Proteinderivat, ebenfalls in geringerem Ausmaß erfolgte, sollte anschließend untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die beiden unterschiedlichen YadA-Kopf-Derivate die IL-8-Sekretion induzieren können.

4.9.5 Analyse der durch YadA-Kopf-Derivate induzierten IL-8-Sekretion

Bei einer bakteriellen Infektion eukaryotischer Zellen induzieren sowohl $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ als auch $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}$ die Sekretion des Zytokins IL-8 (siehe Kapitel 4.4.3). Nach den ersten Ergebnissen der Signaltransduktionsanalyse und der beobachteten Aktivierung der in der IL-8-Sekretion involvierten ERK p44/42 Kinasen lag die Vermutung nahe, dass auch die Infektion mit den beiden YadA-Kopf-Derivaten die IL-8-Sekretion induziert. HEp-2 Zellen wurden über Nacht mit verschiedenen

Konzentrationen (10-500 µg/ml) $\text{YadA}_{p\text{stb}}\text{aa26-253}$ und $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}\text{aa26-253}$ inkubiert

Wie Abbildung 4.21 zu entnehmen ist, konnte mittels IL-8-ELISA jedoch keinerlei IL-8 in den Zellüberständen nach der Infektion mit den gereinigten YadA-Kopf-Derivaten nachgewiesen werden. Es wird deutlich, dass die Zytokinsekretion nicht allein durch die YadA-Proteinderivate induziert werden kann.

Des Weiteren zeigt dieses Ergebnis, dass die Phosphorylierung der p44/42 Kinasen allein nicht ausreichend ist, um die IL-8-Ausschüttung zu induzieren und somit die Aktivierung weiterer Signalmoleküle erforderlich ist.

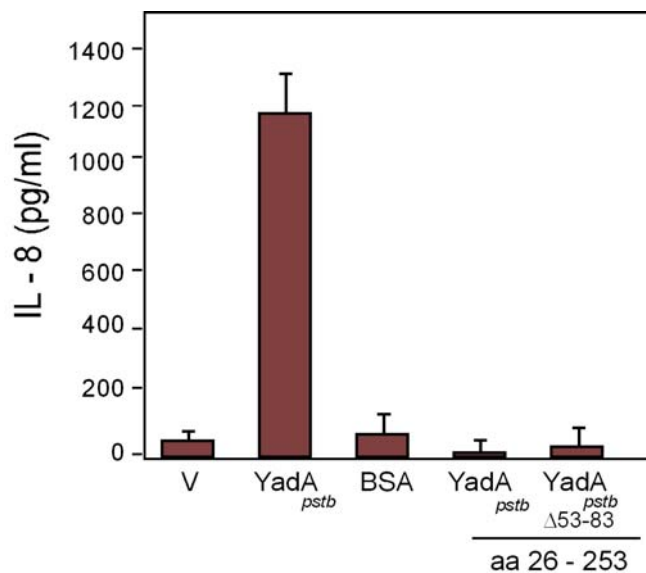


Abb. 4.21: Induktion der IL-8-Sekretion bei Inkubation mit den YadA-Kopf-Derivaten. 5×10^4 HEp-2 Zellen wurden für 4 h oder über Nacht mit 10^6 YadA-exprimierenden Bakterien bzw. je 10 µg/ml YadA-Proteinderivat inkubiert. BSA bzw. der Leervektor pBAD18 (V) wurden als Kontrollen verwendet. Die IL-8-Produktion wurde mittels eines spezifischen ELISAS bestimmt.

5. Diskussion

Die Adhäsion pathogener Erreger an ihre Wirtszellen ist essentiell für die Kolonisation des Gewebes, die Invasion sowie die Verbreitung und Vermehrung der Mikroorganismen im Wirt (Pizarro-Cerda & Cossart, 2006). Um die Anheftung an eukaryotische Zellen zu gewährleisten, exprimieren Bakterien Adhäsine in Form von Pili, Fimbrien und afimbriären Adhäsinen (Oelschlaeger, 2001). Zu den letztgenannten zählt das Außenmembranprotein YadA der enteropathogenen Yersinien, das im Rahmen dieser Arbeit sowohl funktionell als auch strukturell charakterisiert und hinsichtlich seiner Rolle im Infektionsprozess untersucht wurde.

5.1 Charakterisierung der YadA-vermittelten Adhäsion und Invasion

5.1.1 Identifikation der YadA_{pstb}-Invasionsdomäne

Die Außenmembranproteine Invasin und YadA ermöglichen den enteropathogenen *Yersinia* Spezies *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, durch die Bindung an β_1 -Integrine an Wirtszellen zu adhäreren (Heesemann *et al.*, 2006). Die β_1 -Integrine haben über ihre zytoplasmatischen Anteile direkten Kontakt mit verschiedenen, das Aktinzytoskelett beeinflussenden Signalmolekülen der Wirtszellen, so dass in Folge der Interaktion von Invasin mit den Wirtszellrezeptoren eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst wird, die zu einer Umlagerung des Zytoskeletts und Internalisierung der Bakterien führt (Hauck *et al.*; 2006, Bruce-Staskal *et al.*, 2002). Dieser Invasionsmechanismus ist vor allem in der initialen Phase der Infektion von Bedeutung und sichert die Translokation der Yersinien aus dem Ileum in die Peyerschen Plaques, die den Ausgangspunkt für die weitere, überwiegend extrazelluläre Verbreitung im Gewebe darstellen (Vazquez-Torres & Fang, 2000). Analysen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass auch YadA aus *Y. pseudotuberculosis* ein starker Invasionsfaktor ist, der durch die Interaktion mit β_1 -Integrinen Einwanderung vermittelt. Im Gegensatz zu Invasin bindet es dabei nicht direkt, sondern über das als Brückenmolekül fungierende EZM-Protein Fibronektin an Integrine (Eitel & Dersch, 2002).

Während *Y. pseudotuberculosis* somit zwei unabhängige effiziente Invasionsfaktoren besitzt, scheint dies bei *Y. enterocolitica* nicht der Fall zu sein.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Adhäsions- und Invasionsstudien, zeigten in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Heesemann & Grüter (1987), dass YadA_{ent} , trotz einer mit YadA_{pstb} vergleichbaren Adhäsionsleistung an eukaryotische Zellen, nur eine äußerst geringe Invasionsfähigkeit besitzt. Da im Vergleich zu Inv_{pstb} auch das Invasin aus *Y. enterocolitica* den deutlich schlechteren Invasionsfaktor darstellt (Miller, 1992), kann davon ausgegangen werden, dass diese Spezies insgesamt schlechter in die Wirtszellen einwandern kann. Inwieweit die stärkere Invasivität von Inv_{pstb} jedoch einen Vorteil für die Bakterien bei der Infektion darstellt, ist unklar, da sowohl in *Y. enterocolitica* als auch in *Y. pseudotuberculosis* die LD_{50} der jeweiligen *inv*-Mutante nicht stark von der des Wildtyps abweicht. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die inv_{pstb} -Mutante eine verringerte Effizienz bei der Besiedlung der Peyerschen Plaques in der frühen Phase der Infektion aufweist (Pepe & Miller, 1993; Marra & Isberg, 1997).

Dersch & Isberg (2000) konnten die geringere Invasivität des Inv_{ent} auf das Fehlen einer in Inv_{pstb} vorhandenen Domäne (D2) zurückführen. Diese Domäne vermittelt die Fähigkeit Invasin-Multimere auszubilden, wodurch ein Clustering der Integrine ausgelöst wird. Es resultiert in einer Verstärkung der für die Internalisation der Bakterien notwendigen Signaltransduktionskaskaden (Dersch & Isberg, 1999). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wird auch die unterschiedliche Invasivität der YadA_{ent} - und YadA_{pstb} -Proteine durch eine zusätzliche invasions-spezifische Domäne in YadA_{pstb} hervorgerufen. Vergleiche der YadA -Aminosäuresequenz verschiedener *Yersinia* Spezies und Stämme zeigten sowohl in der Stiel- als auch in der Kopfregion der Proteine Unterschiede. Mehrere Insertionen in der Stieldomäne des YadA_{ent} -Proteins führen zu einem längeren Molekül, das aber aufgrund einer Deletion im N-Terminus eine kleinere Kopfdomäne aufweist. Da bekannt ist, dass diese Domäne für verschiedene adhäsive Eigenschaften des Proteins, wie die Bindung an Neutrophile und an extrazelluläre Matrixproteine, verantwortlich ist (Tamm *et al.*, 1993; Roggenkamp *et al.*, 1996; Tahir *et al.*, 2000), war anzunehmen, dass Abweichungen in diesem Bereich auch ursächlich für die unterschiedlichen invasiven Eigenschaften sein könnten.

Funktionelle Studien zur Bedeutung der in $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ zusätzlich vorhandenen Aminosäureregion (aa53-83) machten deutlich, dass sich die $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}$ -, $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ - und YadA_{ent} -vermittelte Adhäsion nicht signifikant voneinander unterscheiden. In Übereinstimmung damit konnten Studien von Roggenkamp *et al.* zeigen, dass sich eine Deletion der Aminosäuren 29–81 nicht auf die YadA_{ent} -vermittelte Adhäsion auswirkte (1996), obwohl die gesamte Kopf- und Nackenregion als Bindedomäne des YadA_{ent} -Proteins identifiziert werden konnte (2003). Die Mutante $\Delta 29-81$ war jedoch stark in ihrer Virulenz abgeschwächt und nicht mehr in der Lage an PMNs zu binden und die Superoxidfreisetzung zu verhindern. Dies deutet darauf hin, dass der extreme N-terminale Bereich der Kopfdomäne für diese Aktivität verantwortlich ist. Die Invasionsfähigkeit war nicht Gegenstand der genannten Analysen. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, sind die weiter zentral in der Kopfdomäne lokalisierten Aminosäuren 53-83 des $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -Proteins von entscheidender Bedeutung für die YadA -vermittelte Invasion. Die Deletion dieser 31 Aminosäuren hatte sehr drastische Auswirkungen: $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}$ -exprimierende *E. coli* K-12 oder *Y. pseudotuberculosis* YP31 Stämme konnten, ähnlich wie die YadA_{ent} -exprimierenden Bakterien, nur in sehr geringem Maße in eukaryotische Zellen einwandern. Da die Adhäsionsfähigkeit durch die Mutation unbeeinträchtigt blieb, wurde deutlich, dass es sich bei der Region der Aminosäuren 53-83 um eine invasionsspezifische Domäne handelt.

Analysen zu Invasin aus *Y. pseudotuberculosis* zeigten, dass die Invasions- und Adhäsionsfähigkeit eines Proteins mit einzelnen Aminosäuren assoziiert sein kann. Die funktionelle Bedeutung der für die Invasion essentiellen Aminosäuren Asp911 und 811 des $\text{Inv}_{p\text{stb}}$ besteht darin, dass sie bei der Bindung an β_1 -Integrine den natürlichen Liganden Fibronektin nachahmen können (Leong *et al.*, 1993, 1995; Saltman *et al.*, 1996). Fibronektin ist ein modular aufgebautes Molekül, das von sich wiederholenden Strukturelementen (Typ I, II oder III) gebildet wird (Ruoslahti, 1988). Die Integrine binden innerhalb des Fibronektin Typ III repeats an die Domänen neun und zehn, wobei die Domäne neun das Erkennungsmotiv RGD enthält und der Domäne zehn ein synergistischer Effekt zukommt (Redick *et al.*, 2000; Altroff *et al.*, 2003). Das Asp911 der Domäne D5 des $\text{Inv}_{p\text{stb}}$ -Proteins nimmt bei der Bindung an die β_1 -Integrine die Funktion des konservierten Aspartats des RGD-Motivs des Fibronektins ein. Ferner wird davon

ausgegangen, dass Asp811 der Domäne D4 mit einer in der Synergierregion vorhandenen Aminosäure korrespondiert. So bilden die Domänen D4 und D5 des Invasins eine für die Integrinbindung notwendige Superdomäne aus (Leong *et al.*, 1995; Saltman *et al.*, 1996; Isberg *et al.*, 2000), die mit einer 100fach stärkeren Affinität an die Wirtszellrezeptoren bindet (Tran Van Nhieu & Isberg, 1993). Möglicherweise ist das starre Arrangement von D4 und D5 im Vergleich zu dem flexibleren Aufbau des Fibronektins für die höhere Affinität des Invasins verantwortlich (Niemann *et al.*, 2003).

Eine ähnlich starke Eingrenzung der Aminosäuren, die für die YadA-vermittelte Invasion essentiell sind, konnte nicht vorgenommen werden. Zwar ermöglichte die gezielte Mutagenese einzelner Aminosäuren der YadA_{pstb}-Invasionsdomäne zwei Aminosäuren (A58E und K59A) zu identifizieren, deren Austausch die Invasion um 60-70 % reduzierte. Das Adhäsionsvermögen dieser YadA-Mutanten war allerdings ebenfalls verringert, so dass diese Aminosäuren nicht als invasions-spezifisch bezeichnet werden können. Die Einführung zweier kürzerer Deletionen in diesem Bereich mit jeweils 15 (Δ 53-67) bzw. 16 (Δ 68-83) deletierten Aminosäuren führte zu einer Verringerung der Invasionsleistung um 50-70 %. Der Effekt dieser Mutationen war somit nicht so stark wie derjenige, der durch die Deletion der 31 Aminosäuren hervorgerufen wurde, bestätigte aber die funktionelle Bedeutung der 31 Aminosäuren-Region für die YadA_{pstb}-vermittelte Invasion. Um genauere Einblicke in die Binde- und Internalisationsdomäne zu erhalten, sind weitere YadA-Strukturanalysen wie z. B. Kristallstrukturanalysen erforderlich. Darüber hinaus ist es möglich, dass eine zusätzliche Region oder einzelne, außerhalb der Invasionsdomäne lokalisierte Aminosäuren des YadA-Proteins zur Invasion beitragen. So wurden in dem SfbI-Protein aus *Streptococcus pyogenes* zwei Domänen identifiziert, die beide essentiell für die Invasion sind. Die „repeat“-Region des SfbI ist zwar ausreichend, um die Adhäsion zu vermitteln, für eine effektive Internalisation der Bakterien ist aber zudem das Vorhandensein einer weiteren strukturbestimmenden Region („spacer“-Region) nötig (Talay *et al.*, 2000, siehe Kapitel 5.1.2). Auch für die Internalin A (InlA)-vermittelte Invasion von *Listeria monocytogenes* sind zwei Domänen des Proteins erforderlich: Die leucinreiche Repeat-Region (LRR) sowie die „inter-repeat“-Region. Letztere ist für die korrekte Faltung der LRRs verantwortlich, ohne die eine Bindung an den Rezeptor des InlA, das E-Cadherin, nicht erfolgen kann (Lecuit *et al.*, 1997).

5.1.2 Identifikation an der YadA_{pstb}-vermittelten Invasion beteiligter wirtszellspezifischer Determinanten

Im Rahmen der Integrin-vermittelten Invasion bieten sich den Mikroorganismen grundsätzlich drei Möglichkeiten: (i) Sie exprimieren ein RGD-beinhaltendes oder RGD-ähnliches Peptid, das den natürlichen Liganden vortäuscht, (ii) sie binden an eine RGD-unabhängige Bindestelle im Integrin oder (iii) sie binden an den natürlichen EZM-Liganden der Integrine und können so die Einwanderung auslösen (Preissner & Chhatwal, 1999). Wie beschrieben, verfolgen YadA_{pstb}-exprimierende Bakterien die letztgenannte Strategie. Sie binden im Gegensatz zu Invasin nicht direkt, sondern über Fibronectin als Brückenmolekül an β_1 -Integrine und vermitteln so die Internalisation der Bakterien (Eitel & Dersch, 2002). Für YadA ist darüber hinaus bekannt, dass es neben Fibronectin auch an die extrazellulären Matrixproteine Kollagen und Laminin binden kann (Tamm *et al.*, 1993, Flügel *et al.*, 1994).

Eine Analyse der Bindefähigkeiten der verschiedenen YadA-Derivate an Moleküle der extrazellulären Matrix konnte dazu beitragen, die Ursachen für das unterschiedliche Invasionsverhalten von YadA_{pstb} und YadA_{ent} aufzuklären. Die Proteine YadA_{pstb}, YadA_{ent} und YadA_{pstb} Δ 53-83 weisen deutliche Unterschiede in ihrem Bindeverhalten an die verschiedenen EZM-Moleküle auf. Nur YadA_{pstb} ist in der Lage stark an Fibronectin zu binden. Die Bindekapazitäten von YadA_{ent} und YadA_{pstb} Δ 53-83 für Fibronectin sind hingegen deutlich schlechter. Ein gegensätzliches Verhalten konnte im Fall von Kollagen und Laminin beobachtet werden: YadA_{ent} und YadA_{pstb} Δ 53-83-Proteine binden stark an Kollagen und Laminin, während das YadA_{pstb}-Protein nur eine geringe Bindefähigkeit für diese beiden EZM-Proteine besitzt. Die Ergebnisse zeigen, dass der Verlust der Region der 31 Aminosäuren zu einer Konversion der EZM-Bindesepezifität führt. Dies könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass die Region der Aminosäuren 53-83 selbst die Binderegion für Fibronectin darstellt (siehe Abbildung 5.1 A). Andererseits könnte die Deletion auch die Struktur des YadA-Trimers derart beeinflussen, dass für die Fibronectinbindung wichtige Aminosäuren verdeckt (siehe Abbildung 5.1 B) und andere, für die Bindung an Kollagen und Laminin wichtige Aminosäuren, exponiert werden. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass die Kollagenbindung allein durch die starke Bindung von YadA_{pstb} an Fibronectin kompetitiv

verhindert wird, da YadA_{pstb} auch in Abwesenheit von Fibronectin nur in geringem Maße mit Kollagen interagiert.

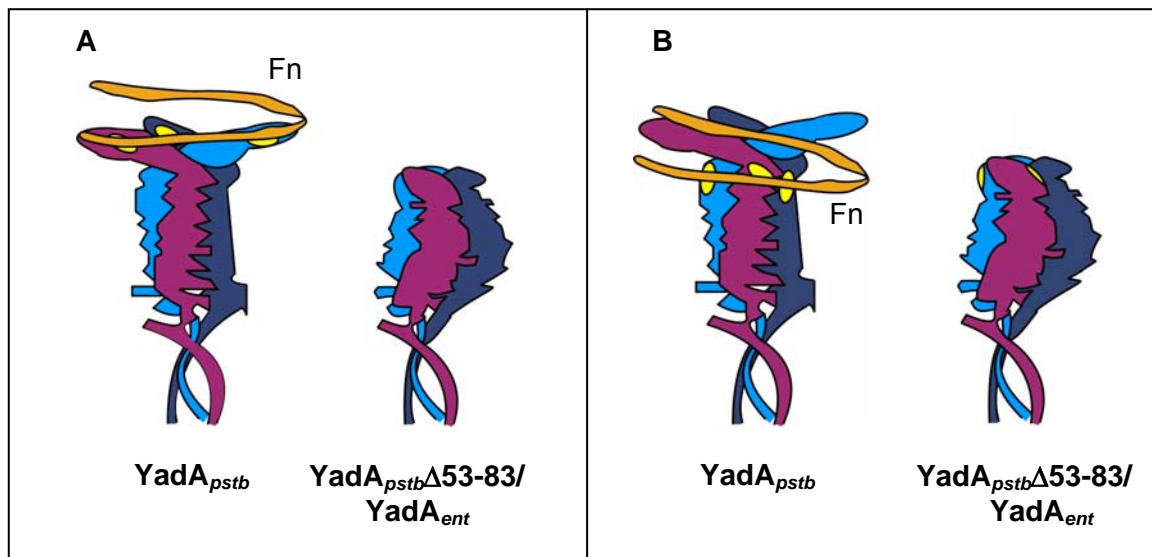


Abb. 5.1: Modell zur Bindung von Fibronectin (Fn) in der YadA-Kopfregion. Schematische Darstellung zur Lokalisation der Fibronectinbindestelle (●). **(A)** Die Fibronectinbindestelle ist in der Region der in YadA_{pstb} zusätzlichen 31 Aminosäuren lokalisiert. **(B)** Die Fibronectinbindestelle ist nicht innerhalb der in YadA_{pstb} zusätzlichen 31 Aminosäuren lokalisiert. Die Deletion bzw. das Fehlen der 31 Aminosäuren verursacht jedoch eine Konformationsänderung in $\text{YadA}_{pstb}\Delta 53-83$ und YadA_{ent} , so dass die Fibronectinbindestelle unzugänglich ist.

Die Ergebnisse der Bindestudien legen nahe, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Fähigkeit von YadA, an Fibronectin zu binden und der Fähigkeit, Invasion zu vermitteln, besteht. Dieser konnte in Antikörper-Inhibitionsexperimenten bestätigt werden. Die Vorinkubation von HEp-2 Zellen mit gegen Fibronectin gerichteten Antikörpern führte zu einer starken Reduktion der YadA-vermittelten Invasion, während sich Kollagen- und Laminin-Antikörper nicht negativ auf die Internalisation auswirkten. Der invasionsdefiziente Phänotyp der YadA_{ent} und $\text{YadA}_{pstb}\Delta 53-83$ -Proteine kann demzufolge auf ihre geringe Fibronectinbindefähigkeit zurückgeführt werden.

Verschiedene weitere pathogene Mikroorganismen wie beispielsweise *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* und *Neisseria gonorrhoeae* sind mittels ihrer adhäsiven Proteine ebenfalls dazu in der Lage, an Fibronectin zu binden (Preissner & Chhatwal, 1999) und die Aufnahme in eukaryotische Zellen zu induzieren (Joh *et al.*, 1999; Hauck & Meyer, 2003). Sowohl in dem F1-Protein als auch in dem homologen SfbI-Protein von *S. pyogenes* wurden zwei, für die Bindung an Fibronectin und die Invasion essentielle Domänen identifiziert (Talay *et al.*, 2000; Ozeri *et al.*, 1996). Die so genannte „repeat“-Region des SfbI-

Proteins vermittelt zunächst die Adhäsion an Fibronectin. Dadurch kommt es zu strukturellen Veränderungen innerhalb der „spacer“-Region des SfbI-Proteins, so dass auch diese an Fibronectin binden und nun die Invasion in die eukaryotischen Zellen induzieren kann (Talay *et al.*, 2000). Auch für die Fibronectinbindepoteine FnbpA von *S. aureus* und FnbA sowie FnbB von *Streptococcus dysgalactiae* wurde gezeigt, dass diese infolge der Fibronectinbindung eine veränderte Struktur aufweisen (House-Pompeo *et al.*, 1996). Aufgrund der klinischen Bedeutung von Staphylokokken und Streptokokken sind die Fibronectinbindepoteine (FnBP) der grampositiven Bakterien bereits im Detail untersucht, so dass Gemeinsamkeiten und Mechanismen ihrer Bindung bekannt sind. Die FnBPs haben eine molekulare Organisation, bei der die Fibronectinbindeaktivität in der C-terminalen Hälfte in Form von sich wiederholenden, 35-40 Aminosäuren umfassenden Sequenzen lokalisiert ist. Das repetitive Auftreten der Bindesequenzen trägt eventuell dazu bei, eine kritische Dichte an Fibronectin zu binden und so ein Clustering der Integrine, ähnlich wie bei der Invasin-Integrin-Interaktion, auszulösen (Schwarz-Linek *et al.*, 2006). Dieser Fibronectin-Bindemechanismus scheint weit verbreitet, da er auch für das BBK32-Protein des zu den Spirochäten zählenden Bakteriums *Borrelia burgdorferi* nachgewiesen werden konnte (Raibaud *et al.*, 2005). Möglicherweise sind auch in YadA mehrere Fibronectinbindedomänen erforderlich, um eine effiziente Internalisation zu gewährleisten. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Fähigkeit an Fibronectin zu binden, nicht zwangsläufig zu einer Einwanderung der Bakterien führt. Beispielsweise konnten die Mutantenproteine YadA_{postb}A58E und K59A keine effiziente Invasion in Wirtszellen vermitteln, obwohl sie weiterhin sehr effizient an Fibronectin binden konnten. Die Bindung an dieses extrazelluläre Matrixprotein muss somit offenbar auf eine ganz spezifische Weise erfolgen, damit es so mit den β_1 -Integrine interagieren kann, dass die zur Internalisation führende Signaltransduktionskaskade ausgelöst wird. So konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit davon, ob die RGD-Region oder aber N-terminale Fragmente des Fibronectins an $\alpha_5\beta_1$ -Integrine binden, unterschiedliche Signalwege in der Zelle initiiert werden (Hocking *et al.*, 1998). Die Komplexität dieses Invasionsmechanismus wird ferner dadurch verdeutlicht, dass Fibronectin-beschichtete Latexkugeln nur sehr ineffizient in eukaryotische Zellen aufgenommen werden (Hook *et al.*, 1989; Dersch & Isberg, 1999). Gerade initiierte, weitere detaillierte Analysen, sowie die

Untersuchung der Kristallstruktur des Fibronektin-YadA-Komplexes, könnten zu einem besseren Verständnis der YadA_{pstb}-vermittelten Invasion beitragen.

Fibronektin bindet an die $\alpha_5\beta_1$ -, $\alpha_v\beta_1$ -, $\alpha_4\beta_1$ - und $\alpha_8\beta_1$ -Integrin-Rezeptoren, während Kollagen an $\alpha_1\beta_1$ -, $\alpha_2\beta_1$ -, $\alpha_{10}\beta_1$ - und $\alpha_{11}\beta_1$ - und Laminin an $\alpha_3\beta_1$ -, $\alpha_6\beta_1$ - und $\alpha_7\beta_1$ -Integrine bindet (Hynes, 2002). Die Klasse der jeweils durch die verschiedenen EZM-Proteine gebundenen Integrine könnte im Zusammenhang mit der Effizienz der bakteriellen Invasion stehen. So wurde beispielsweise für den Integrintyp $\alpha_5\beta_1$ gezeigt, dass er hohe Invasionsraten vermitteln kann (Isberg & Leong, 1990; Hynes *et al.*, 1992). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten Invasionsstudien mit inhibitorischen Antikörpern, dass nur die $\alpha_5\beta_1$ -Integrine an dem YadA_{pstb}-vermittelten Invasionsprozess beteiligt sind. Interessanterweise wurde eine funktionelle Rolle der $\alpha_5\beta_1$ -Integrine ebenfalls für den bakteriellen Invasionsprozess von *S. aureus*, *Shigella flexneri* und *Neisseria meningitidis* nachgewiesen (Hauck *et al.*, 2006; Scibelli *et al.*, 2007; Virji *et al.*, 1994; Watarai *et al.*, 1996). Demnach scheinen besonders $\alpha_5\beta_1$ -Integrine sehr invasionskompetent zu sein. Gegen andere α -Untereinheiten gerichtete Antikörper hatten keinen negativen Effekt auf die Invasionsleistung YadA_{pstb}-exprimierender Bakterien. Da, wie beschrieben, Kollagen und Laminin aber keine Bindung an $\alpha_5\beta_1$ -Integrine vermitteln, kann die starke Bindung von YadA_{ent} und YadA_{pstb} Δ 53-83 an diese EZM-Moleküle demzufolge nicht zu einer Internalisation der Bakterien führen (siehe Abbildung 5.2).

Tran Van Nhieu & Isberg (1993) sowie Dersch & Isberg (1999, 2000) konnten zeigen, dass die β_1 -Integrin-vermittelte Invasion stark von der Affinität und Multimerisierung des Liganden sowie dem Clustering der Rezeptoren abhängig ist. Weiterführende Analysen sind notwendig um aufzuklären, ob auch bei der β_1 -Integrin-vermittelten Invasion durch YadA_{pstb} ein Clustering der Rezeptoren über die Fibronektin-Brückenbildung erfolgen muss, um eine effiziente Internalisation hervorzurufen.

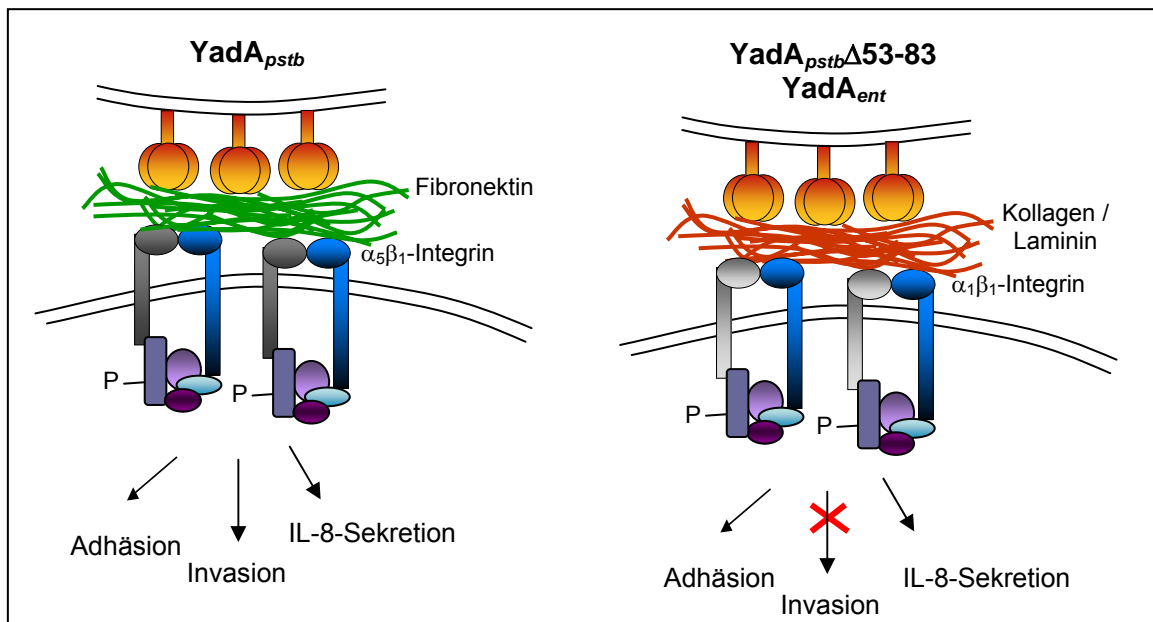


Abb. 5.2: Modell der Interaktion verschiedener YadA-Proteine mit eukaryotischen Wirtszellen. Schematische Darstellung von YadA_{pstb}- und YadA_{pstb}Δ53-83- bzw. YadA_{ent}-exprimierenden Bakterien, die in Abhängigkeit der gebundenen EZM-Moleküle und Integrinklassen sowohl Adhäsion, Invasion als auch IL-8-Sekretion oder nur Adhäsion und IL-8-Sekretion vermitteln können.

5.1.3 Einfluss der Invasionsdomäne auf weitere YadA-vermittelte Virulenzeigenschaften

5.1.3.1 Autoagglutination und Hämagglutination

Neben den beschriebenen adhäsiven und invasiven Eigenschaften hat YadA weitere wichtige Funktionen. So vermittelt es beispielsweise die Autoagglutination in der stationären Phase (Balligand *et al.*, 1985; Skurnik *et al.*, 1984). Dabei kommt es aufgrund einer Reißverschluss-ähnlichen Interaktion von Kopf- und Stielregion verschiedener YadA-Moleküle zu einer Aggregation der YadA-exprimierenden Bakterien (Hoiczky *et al.*, 2000). Da die Kopfreion an diesem Prozess beteiligt ist, erscheint es plausibel, dass die Invasionsdomäne von Bedeutung für die Autoagglutination ist. Sowohl YadA_{ent} als auch YadA_{pstb}Δ53-83 sind, wenn sie in *E. coli* K-12 oder *Y. pseudotuberculosis* YP31 exprimiert werden, nicht in der Lage eine Aggregation der Bakterien auszulösen. Dies wird auch durch Ergebnisse einer Studie von Tamm *et al.* (1993) bestätigt, in der eine Deletion der benachbart gelegenen, konservierten hydrophoben Region der Aminosäuren 83-101 in YadA_{ent} zu einem Verlust der Autoagglutinationsfähigkeit führte. Die, wie YadA, zu den „Trimeren Autotransporter-Adhäsinen“ zählenden

Proteine VompA aus *Bartonella quintana*, Hag aus *Moraxella catarrhalis* und Hap aus *Haemophilus influenzae* sind ebenso in der Lage, Autoagglutination zu induzieren, wobei im Fall von Hap nicht der N-, sondern der C-Terminus involviert ist (Zhang *et al.*, 2004; Pearson *et al.*, 2002; Fink *et al.*, 2003). Diese Form der Mikrokoloniebildung wird als Zwischenschritt der Biofilmbildung diskutiert (Hendrixson & St. Geme, 1998) und stellt daher für Bakterien einen Schutzmechanismus gegen die Wirtsabwehr und die Wirkung antimikrobieller Peptide dar (Donlan *et al.*, 2002). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die zusätzlichen 31 Aminosäuren in der YadA_{pstb}-Kopfdomäne darüber hinaus auch für die YadA-vermittelte Hämagglutination notwendig sind, kann dieser Region, neben ihrer Bedeutung für die Invasion, ebenfalls ein direkter Einfluss auf die aggregativen Eigenschaften von YadA zugeordnet werden. Die Hämagglutination ist häufig mit der Expression von Adhäsinen assoziiert, die an der Kolonisation von Schleimhäuten beteiligt sind und wird beispielsweise auch von dem Hag-Protein aus *M. catarrhalis* und von den Typ IV Pili von *Vibrio cholerae* vermittelt (Pearson *et al.*, 2002; Marsh *et al.*, 1999).

5.1.3.2 Serumresistenz

Analog zu BrkA aus *Bordetella pertussis*, dem M-Protein von Gruppe A-Streptokokken und DsrA aus *Haemophilus ducreyi* stellt YadA für Yersinien einen Schutz gegen den bakteriolytischen Effekt des humanen Serums dar (Biedzka-Sarek *et al.*, 2005; Fernandez & Weiss 1994; Blackmore *et al.*, 1998; Elkins *et al.*, 2000). Die in dem humanen Serum enthaltenen Komponenten des Komplementsystems sind ein Teil des unspezifischen Immunsystems und dienen der Elimination eingedrungener Mikroorganismen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass YadA_{pstb}, YadA_{ent} und YadA_{pstb}Δ53-83 gleichermaßen eine Resistenz gegenüber dem bakteriolytischen Effekt des menschlichen Serums vermitteln können und die Aminosäuren 53-83 der N-terminalen Kopfregion des YadA-Proteins daher nicht für die Serumresistenz von Bedeutung sind. Übereinstimmend hiermit demonstrierten Roggenkamp *et al.* (2003), dass die Kopf- und Nackendomäne des Yad_{ent}-Proteins für die Serumresistenz entbehrlich, die Anker- und Stielregion jedoch zwingend notwendig sind. Auch das Ail-Protein enteropathogener Yersinien trägt zur Serumresistenz bei. Während dies jedoch

eher für kurzzeitiges Überleben von Bedeutung ist, bietet YadA längerfristig Schutz (Biedzka-Sarek *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass YadA an den Faktor H des Komplementsystems bindet und so die Opsonisierung der Bakterien verhindert. Dies wurde bereits für OspE aus *Borrelia burgdorferi* und das M-Protein der Gruppe A-Streptokokken beschrieben (Blackmore *et al.*, 1998; Hellwage *et al.*, 2001). Untersuchungen zur Rolle des LPS bei der Vermittlung der Serumresistenz zeigten eine eher negative Wirkung, da das O-Antigen möglicherweise Angriffsziel von Antikörpern oder Lektinen ist (Biedzka-Sarek *et al.*, 2005). Folglich könnte der Effekt von YadA zusätzlich darauf beruhen, dass es das LPS durch seine lange oberflächenexponierte Struktur verdecken und somit vor dem Angriff durch Antikörper schützen kann (Hoiczky *et al.*, 2000).

5.1.3.3 IL-8-Sekretion

Bei einer Infektion mit enteropathogenen Bakterien produzieren Epithelzellen häufig verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise das Interleukin-8 (Jung *et al.*, 1995). Es stellt einen starken Lockstoff für neutrophile Granulozyten dar und ist besonders für die frühe Wirtsantwort auf bakterielle Infektionen von Bedeutung (Baggiolini & Clark-Lewis., 1992). Die Afa/Dr Adhäsine von *E. coli* und das Flagellin von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium induzieren ebenso wie Invasin und YadA die Produktion dieses Zytokins (Betis *et al.*, 2003; Gewirtz *et al.*, 2001; Schulte *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2004; Eitel *et al.*, 2005). Die Induktion der IL-8-Sekretion durch die beiden *Yersinia*-Außenmembranproteine wird als Pathogenitätsstrategie angesehen. Die phagozytose-resistenten Yersinen scheinen die aufgrund der Anlockung und Einwanderung der PMNs aufgelockerten Zell-Zell-Kontakte für ihre Ausbreitung im Wirt und die Besiedlung tieferer Gewebe zu nutzen (McCormick *et al.*, 1997). Da sowohl $\text{YadA}_{p\text{stb}}$, YadA_{ent} als auch $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}$ die IL-8-Sekretion nahezu gleich stark induzieren, ist diese von der Invasion unabhängig und erfolgt allein durch die Adhäsion der Bakterien (siehe Abbildung 5.2). Dies konnte parallel auch durch Ergebnisse von Eitel *et al.* (2005) bestätigt werden, die zeigten, dass eine Blockierung der für die Internalisation nötigen Aktinumlagerung durch Cytochalasin D keinen Einfluss auf die IL-8-Sekretion hatte.

5.1.4 Identifikation der Kollagenbindedomäne in YadA_{pstb}

In dieser Arbeit konnten durch gerichtete Mutagenese die Binderegionen für Kollagen, Laminin und Fibronectin innerhalb des YadA-Proteins näher charakterisiert werden. Mit Hilfe der von Nummelin *et al.* (2004) kristallisierten rekombinanten Bindedomäne des YadA_{ent}-Proteins konnte eine Reihe von Aminosäuren identifiziert werden, die für die Kollagenbindung von Bedeutung sind. Der Austausch der zwei beteiligten Aminosäuren V133D und N134A resultierte sowohl in YadA_{pstb} als auch in YadA_{pstb}Δ53-83 in einer drastischen Reduktion der Kollagenbindung, so dass diese Aminosäuren auch in YadA_{pstb} als essentiell für die Kollagenbindung betrachtet werden können. Da YadA_{pstb}Δ53-83 im Vergleich zu YadA_{pstb} mehr als zweifach stärker an Kollagen bindet, ist anzunehmen, dass in diesem Protein weitere Aminosäuren exponiert sind, die für die erhöhte Bindefähigkeit verantwortlich sind. Möglicherweise sind, ähnlich wie in dem zu der Klasse der „Trimeren Autotransporter-Adhäsine“ zählenden Hap-Protein aus *H. influenzae*, zwei Domänen für die Kollagen- und Lamininbindung erforderlich (Fink *et al.*, 2002, 2003). Denkbar ist auch, dass in YadA_{pstb} die Aminosäuren V133 und N134 weniger gut an der Oberfläche exponiert und zugänglich sind als in YadA_{pstb}Δ53-83 und sich darin die geringere Kollagenbindefähigkeit von YadA_{pstb} begründet. Wie die Kristallisierung der Kollagenbindedomäne vermuten lässt, wird das YadA_{ent}-Molekül bei der Interaktion mit dem Kollagenmolekül gebogen, wodurch gleichzeitig wichtige Aminosäuren für die Bindung exponiert werden (siehe Abbildung 5.3 A). Eventuell sind diese, angesichts der in YadA_{pstb} zusätzlich vorhandenen Invasionsdomäne, aber trotz der Biegung des Moleküls für die Kollagenhelix unzugänglich (siehe Abbildung 5.3 B). Alternative Molekülbiegungen könnten durch die Exposition verschiedener Bindedomänen somit die diversen Funktionen des YadA-Moleküls bedingen.

Zur Bindung von Kollagen sind, neben YadA und dem Hap-Protein, weitere Vertreter der „Trimeren Autotransporter-Adhäsine“ wie EmeA aus *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und VompC aus *Bartonella quintana* befähigt (Cotter *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2006). VompC gehört zu einer hochkonservierten Genfamilie, die nur geringfügig in ihrer Sequenz variiert und verschiedene Funktionen einnimmt. Während die hochhomologen VompA Variante eine deutlich geringere Kollagenbindefähigkeit zeigt, konnte für sie jedoch eine autoaggregative

Eigenschaft nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 2004). Dieses Beispiel belegt, dass sehr ähnliche Proteine durchaus sehr unterschiedliche und vielfältige Virulenzeigenschaften haben können, wie es auch bei den eng verwandten $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ - und YadA_{ent} -Proteinen der Fall ist.

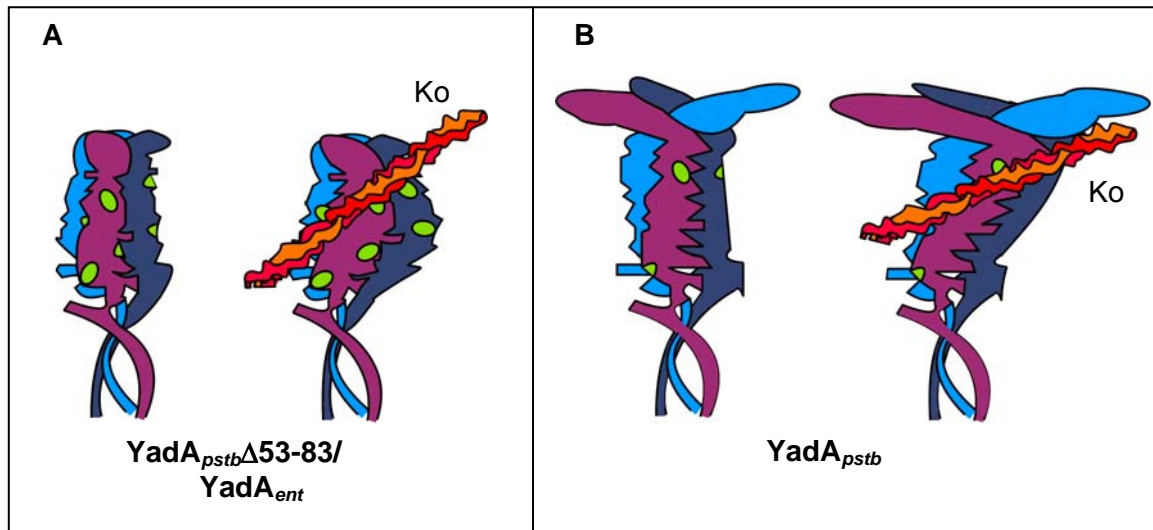


Abb. 5.3: Modell zur Exposition von Kollagenbindestellen in der YadA-Kopfregion. Schematische Darstellung zur Biegung des YadA-Moleküls infolge der Bindung an Kollagen (Ko). **(A)** In $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}$ und YadA_{ent} verursacht die Biegung des Moleküls bei der Kollagenbindung gleichzeitig die Exposition weiterer Kollagenbindestellen (●). **(B)** Zwar kommt es in $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ infolge der Bindung des Kollagens ebenfalls zu einer Biegung des Moleküls, es erfolgt jedoch dadurch keine Exposition weiterer hochaffiner Bindestellen.

Während die Aminosäuren V133 und N134 in $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ und $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}$ keine Bedeutung für die Fibronektinbindung haben, waren im Gegensatz dazu die Mutanten nicht mehr in der Lage an Laminin zu binden. Es ist daher davon auszugehen, dass die Kollagen- und Lamininbindestellen überlappend bzw. sehr eng beieinander und getrennt von der Fibronektinbindestelle lokalisiert sind. Ein Einfluss der Mutation auf die $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -vermittelte Invasion konnte nicht festgestellt werden, so dass $\text{YadA}_{p\text{stb}}\text{V133D}$, N134A und $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}\text{V133D}$, N134A geeignet sind, um im Tierversuch die Bedeutung der Kollagenbindung für die Pathogenese und Virulenz von Yersinien aufzuklären.

Nummelin *et al.* (2004) machten deutlich, dass die zu diesem Zeitpunkt postulierten Kollagenbindestellen von rein struktureller Bedeutung sind. Demnach haben die insgesamt achtmal auftretenden NSVAIGXXS-Motive (Tahir *et al.*, 2000) eine stabilisierende Funktion für die Windungen des Proteins und bilden den hydrophoben Kern des Trimers aus. Der beobachtete Verlust der Kollagenbindung ist auf die gestörte Trimerisierung des Moleküls zurückzuführen. Dies

hatten auch die Außenmembranpräparationen der konstruierten Mutanten gezeigt. Die Deletion der Aminosäuren 118-139 (Tamm *et al.*, 1993) resultiert in einer intramolekularen Rearrangierung, die zwar nicht die Trimerisierung verhindert, aber funktionell wichtige Aminosäuren in das Innere des Moleküls verschiebt und deshalb den beobachteten Funktionsverlust dieser Mutanten hervorruft.

Bisher wurden nur zwei weitere Strukturen bakterieller Kollagenbindedomänen charakterisiert: Die der Klasse I Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* und die des Cna-Proteins aus *S. aureus*. Diese zeigen jedoch weder hinsichtlich ihrer Struktur noch in ihrer Aminosäureabfolge Gemeinsamkeiten. Für Cna aus *S. aureus* wurde ein Bindungsmodell postuliert, bei dem es infolge hydrophober Interaktionen zwischen Protein und Ligand und einer strukturellen Reorganisation zur „Umarmung“ der Kollagenhelix durch die zwei Subdomänen des Cnas kommt (Symersky *et al.*, 1997; Zong *et al.*, 2005). Innerhalb der Typ I Kollagenase konnte hingegen die Aminosäure Tyr994 als bedeutend für die Kollagenbindung identifiziert werden (Wilson *et al.*, 2003).

5.1.5 Einfluss der invasionsdefizienten YadA-Derivate auf die Invasin-vermittelte Invasion

Während das Invasin-Protein bei moderaten Temperaturen maximal synthetisiert wird und somit schon zu Beginn einer Infektion auf der Bakterienoberfläche vorhanden ist, erfolgt die YadA-Expression erst bei 37°C (Nagel *et al.*, 2001; Eitel & Dersch, 2002). Es ist daher anzunehmen, dass es im Verlauf einer Infektion zur gleichzeitigen Expression dieser beiden Proteine kommt, wobei YadA als deutlich größeres Molekül das Invasin in seiner Funktion behindern könnte (Hoiczkyk *et al.*, 2000; Hamburger *et al.*, 1999). Es ist bereits bekannt, dass bei gleichzeitiger Expression der Transport und Einbau beider Proteine in die Außenmembran nicht gestört wird (Eitel & Dersch, 2002; Hudson *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde bei gleichzeitiger Expression von YadA_{p_{stb}} und Inv_{p_{stb}} ein additiver Effekt hinsichtlich der Anzahl eingewanderter Bakterien beobachtet (Eitel & Dersch, 2002).

Adhäsions- und Invasionsstudien mit sowohl YadA als auch Invasin-exprimierenden *E. coli* K-12 Stämmen zeigten, dass die invasionsdefizienten

YadA-Derivate die Invasin-vermittelte Invasion in Epithelzellen nicht negativ beeinflussen. Dies traf sowohl für $\text{Inv}_{p\text{stb}}$ als auch Inv_{ent} zu. Die starke Bindeaffinität von YadA_{ent} und $\text{YadA}_{p\text{stb}\Delta 53-83}$ an Kollagen und Laminin behinderte die direkte Bindung an die invasionsvermittelnden $\alpha_5\beta_1$ -Integrine demnach nicht. Die Fähigkeit der $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -exprimierenden Bakterien, an Fibronectin zu binden, könnte für den zu beobachtenden additiven Effekt bei gleichzeitiger Expression der $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ - und der verschiedenen Inv-Derivate verantwortlich sein. Hudson *et al.* (2005) hatten in einem ähnlichen Versuchsansatz allerdings festgestellt, dass sich $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ bei gleichzeitiger Expression von $\text{Inv}_{p\text{stb}}$ negativ auf die Invasin-vermittelte Phagozytose durch Makrophagen auswirkt. Die Invasion war bei gleichzeitigem Vorhandensein der beiden Proteine in der Außenmembran um ca. 50 % reduziert. Basierend auf den unterschiedlichen Invasionsmechanismen von YadA und Invasin könnten Unterschiede der extrazellulären Matrix am Infektionsort eine entscheidende Rolle für die Invasionseffizienz der beiden Proteine spielen. Demnach käme es nur bei einem hohen EZM-Gehalt zu einer Ausbildung von invasionskompetenten Fibronectin- β_1 -Integrin-Komplexen. Diese begünstigen einerseits die YadA-vermittelte Invasion, behindern jedoch andererseits die Invasin-vermittelte Aufnahme der Bakterien durch Makrophagen, da eine geringere Anzahl fibronectinungebundener Rezeptoren für eine effektive Bindung zur Verfügung steht. Zu bedenken ist jedoch, dass Invasin 100fach affiner als Fibronectin an die β_1 -Integrine bindet und es den natürlichen Liganden demzufolge verdrängen könnte. Analysen unserer Arbeitsgruppe deuten ebenfalls darauf hin, dass bei der Einwanderung in HEp-2 Zellen $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ mit fibronectingebundenen β_1 -Integrinen interagiert. Übereinstimmend mit dem Modell von Hudson *et al.* (2005) führte der Einsatz von Fibronectin-Antikörpern in einem Invasionsassay zu einer erhöhten Einwanderung Invasin-exprimierender Bakterien und die Zugabe von Fibronectin zu einer gesteigerten $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -vermittelten Invasion. Darüber hinaus wurde die $\text{YadA}_{p\text{stb}}$ -vermittelte Invasion durch die Präinkubation von HEp-2 Zellen mit gegen β_1 -Integrine gerichtete Antikörper stark reduziert und konnte durch anschließende Zugabe von Fibronectin leicht gesteigert werden (Eitel & Dersch, 2002). Detailliertere Informationen über den EZM-Gehalt in den verschiedenen eingesetzten Zellkulturen, den J774A.1 Makrophagen und der Epithelzelllinie HEp-2 könnten even-

tuell Aufschluss über die Ursachen für diese unterschiedlichen Beobachtungen geben.

5.1.6 Bedeutung der YadA_{pstb}-Invasionsdomäne für die Virulenz

In *Y. pseudotuberculosis* stellen die stark invasiven Inv- und YadA-Proteine mindestens zwei alternative Internalisationsfaktoren dar (Eitel & Dersch, 2002). Aufgrund ihres durch Umweltsignale regulierten unterschiedlichen Expressionsmusters wird davon ausgegangen, dass sie zu unterschiedlichen Zeiten der Infektion aktiv sind. Invasin wird bereits vor der Aufnahme der Bakterien synthetisiert und sichert so eine schnelle und effiziente Internalisierung in die Wirtszellen des Darms. Im späteren Verlauf der Infektion hingegen wird Invasin nicht mehr gebildet und scheint daher nur eine Bedeutung für den initialen Infektionsschritt zu haben (Ellison *et al.*, 2004; Oellerich *et al.*, 2007). YadA könnte aufgrund seiner Expression bei 37°C vor allem für die spätere Ausbreitung der Yersinien in Darm-assoziierten Geweben und Organen wichtig sein und durch seine Fähigkeit zur Autoagglutination und Biofilmbildung die Kolonisierung erleichtern.

In Tierversuchen mit Balb/c Mäusen sollte untersucht werden, inwieweit sich der durch das Fehlen der invasionsspezifischen 31 Aminosäuren hervorgerufene Verlust der invasiven und aggregativen Fähigkeiten des YadA_{pstb}-Proteins negativ auf den Infektionsverlauf auswirkt. Bei einer oralen Infektion zeigte sich im Vergleich mit YadA_{pstb}, dass die YadA_{pstb}Δ53-83 Mutante ebenso wie eine *Y. pseudotuberculosis* yadA-Nullmutante weiterhin zur initialen Translokation der M-Zellen und der folgenden Ausbreitung im Gewebe fähig war. Allerdings konnte eine abgeschwächte Virulenz beider Mutanten festgestellt werden, da jeweils eine geringere Anzahl von Bakterien in der Lage war, sowohl die Peyerschen Plaques als auch die mesenterialen Lymphknoten und die Milz zu besiedeln. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Han & Miller (1997) zur Rolle von YadA_{pstb} für die Virulenz überein. Interessanterweise hat eine yadA-Nullmutation in *Y. enterocolitica* drastischere Auswirkungen und verhält sich in Mausinfektionsversuchen avirulent (Pepe *et al.*, 1995). Es scheint, als wäre YadA_{pstb}, obwohl es zusätzlich die Fähigkeit besitzt Invasion zu vermitteln, ein weniger bedeutender Virulenzfaktor in *Y. pseudotuberculosis*. Eine Studie von Tamm *et al.* (1993)

stellte den Virulenzverlust einer *yadA*-Nullmutante in direkten Zusammenhang mit dem Verlust der Kollagenbindefähigkeit, da eine konstruierte YadA-Kollagenmutante ebenfalls avirulent im Tierversuch war. Diese Korrelation muss allerdings kritisch betrachtet werden, da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die betreffende YadA-Mutante nicht nur in der Kollagenbindefähigkeit eingeschränkt war, sondern allgemein nicht mehr mit eukaryotischen Wirtszellen interagierte. Es kann daher angenommen werden, dass sich die eingeführte Deletion auch auf die Struktur des YadA-Moleküls auswirkte. Die Strukturanalyse von Nummelin *et al.* (2004) legt zudem nahe, dass diese Deletion zu einer intramolekularen Rearrangierung führt und wichtige Aminosäuren in das Innere des Moleküls verschoben werden. Trotzdem kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die starke Kollagenbindefähigkeit des YadA_{ent} Proteins für die Yersinien von Vorteil im Infektionsprozess ist. Sie könnte eine entscheidende Funktion bei der extrazellulären Adhäsion und Koloniebildung einnehmen, die bei einer Infektion durch *Y. enterocolitica* typischerweise mit einer Abszessbildung in lymphatischen Geweben und Organen einhergeht (Bottone *et al.*, 1977; Autenrieth & Firsching, 1996). Die Bindung von Kollagen würde diese Funktion sichern, da sie nicht, wie die Bindung an Fibronektin und die $\alpha_5\beta_1$ -Integrine, zu einer Internalisation der Bakterien führt. Vermutlich haben YadA_{ent} und YadA_{pstb} somit im Infektionsverlauf unterschiedliche Aufgaben. YadA_{pstb} könnte mit seinen invasiven Fähigkeiten eine Art „Back-up“-System darstellen, das den Bakterien, die sich längere Zeit nach Aufnahme durch den Wirt noch im Darmlumen befinden, ermöglicht die M-Zellen zu passieren und sich in tieferliegende Gewebe zu verbreiten. YadA_{ent} hingegen könnte vor allem für die extrazelluläre Besiedlung von Geweben von Bedeutung sein. Für diese Annahme spricht, dass es bei Infektionen mit *Y. enterocolitica*, im Gegensatz zu denen mit *Y. pseudotuberculosis*, vermehrt zu einer Abszessbildung kommt und seltener die tiefer gelegenen Gewebe und Organe besiedelt werden (Pepe & Miller, 1993). Neueste Ergebnisse von Oellerich *et al.* (2007) zeigten, dass die für die Abszessbildung ursächliche Mikrokoloniebildung durch jeweils einzelne Bakterien gewährleistet wird.

Es fällt schwer, die Rolle von Kollagen und Fibronektin für die Virulenz von Mikroorganismen eindeutig zu beurteilen. So wurden in *S. pyogenes* und *S. aureus* mehrere fibronektinbindende Proteine identifiziert, die sowohl für die

Adhäsion als auch Invasion von großer Bedeutung sind. Im Widerspruch dazu jedoch zeigten zwei weitere Studien, dass die Virulenz dieser Organismen durch die Interaktion mit Fibronectin abgeschwächt wird bzw. in einer Fibronectin-bindeprotein-Mutante erhöht ist (Nyberg *et al.*, 2004; McElroy *et al.*, 2002). Für die Etablierung einer chronischen Niereninfektion durch diffus adhärierende *E. coli* ist zum anderen die Interaktion des kollagenbindenden Dr Adhäsins essentiell (Selvarangan *et al.*, 2004). Des Weiteren ist das kollagenbindende Cna-Protein aus *S. aureus* ein wichtiger Virulenzfaktor für die Keratitis und Osteomyelitis auslösenden Infektionen (Elasri *et al.*, 2002; Rhem *et al.*, 2000). Es existiert darüber hinaus möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Kollagenbindung durch *Y. enterocolitica* und dem Auftreten der reaktiven Arthritis (Grippenberg-Lerche *et al.*, 1995; Lacoste *et al.*, 2006). Ebenso konnte eine Korrelation zwischen der Kollagenbindung durch das M3-Protein von *S. pyogenes* und dem Auftreten einer weiteren Autoimmunkrankheit, dem rheumatischen Fieber, festgestellt werden (Dinkla *et al.*, 2003a). Außerdem wurde eine Verknüpfung zwischen der Bindung an Kollagen und Fibronectin hergestellt werden. Dinkla *et al.* (2003b) zeigten, dass *S. pyogenes*, dessen Mehrzahl an Isolaten nicht in der Lage ist direkt an Kollagen zu binden, dieses über an SfbI gebundenes Fibronectin rekrutiert. Dadurch kommt es zu einer Formation großer bakterieller Aggregate. Dieser Mechanismus stellt eine neue Adhäsions- und Kolonisationsstrategie dar, bei der die Bakterien gegen Phagozytose durch PMNs geschützt sind und demonstriert einen weiteren, für die Virulenz möglicherweise bedeutenden Aspekt der Kollagenbindung.

5.2 Bewertung der Anwendbarkeit löslicher YadA-Proteinderivate für die Analyse der eukaryotischen Signaltransduktion

Nachdem aufgrund der Identifikation der YadA_{pstb}-Invasionsdomäne und der beteiligten wirtszellspezifischen Determinanten die Invasion klar von der Adhäsion abgegrenzt werden kann, können erstmalig die Unterschiede der zu Grunde liegenden eukaryotischen Signaltransduktion untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher analysiert, inwiefern lösliche YadA-Proteinderivate geeignet sind, Adhäsion und Invasion durch die Aktivierung der entsprechenden Signalkaskaden zu vermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass gereinigte, aus der Kopf- und Nacken-Domäne (aa 26-253) bestehende YadA-

Proteinderivate zur selbständigen Trimerisierung fähig und damit für weitere zellbiologische Analysen geeignet sind. Wiedemann *et al.* (2001) bestimmten durch den Einsatz Invasin-beschichteter Latexkugeln einige der an der Invasin-vermittelten Phagozytose beteiligten Signalmoleküle. Des Weiteren wiesen Dersch & Isberg (1999) mittels dieser Methode eine für die Invasion essentielle Domäne des Invasins aus *Y. pseudotuberculosis* nach und konnten durch die Infektion von HEp-2 Zellen mit löslichem Protein das Clustering der Integrine durch die Invasinmoleküle demonstrieren. Durch die Überexpression, Reinigung und Kopplung an Latexkugeln konnten IpaB und C aus *S. flexneri*, SfbI aus *S. pyogenes*, InlA aus *L. monocytogenes* und AfaD aus *E. coli* als Invasionsfaktoren identifiziert bzw. in ihrer Funktion bestätigt werden (Ménard *et al.*, 1996; Molinari *et al.*, 1997; Lecuit *et al.*, 1997; Plancon *et al.*, 2003). Binde- und Invasionsstudien mit an Latexkugeln gekoppelten YadA_{pstb}-Fragmenten zeigten erstmalig, dass der Einsatz von Latexkugeln auch für die Analyse trimerer verkürzter YadA-Kopf-Derivate geeignet ist und daher mit dieser Methodik ebenfalls die Adhäsion und Invasion komplexerer Adhäsine untersucht werden kann. Zudem verdeutlichten die Analysen in Übereinstimmung mit Roggenkamp *et al.* (2003), dass die Aminosäuren 26-253 des YadA-Proteins sowohl für die Adhäsion als auch die Einwanderung in HEp-2 Zellen ausreichend sind.

Da die verkürzten Kopf-/Nackenderivate von YadA_{pstb} und YadA_{pstb}Δ53-83 hinsichtlich der Adhäsion, Invasion und der EZM-Bindung das gleiche Verhalten gezeigt hatte wie die entsprechenden, auf den Bakterien exprimierten Proteine, wurden die löslichen YadA-Kopf-Derivate für Signaltransduktionsanalysen eingesetzt. Ein für die Invasion von Yersinien, *S. pyogenes* und *S. aureus* kritischen Faktor stellt die mit den zytoplasmatischen Anteilen der Integrine assoziierte Fokale Adhäsions Kinase dar (Parsons *et al.*, 2000; Alrutz & Isberg, 1998; Ozeri *et al.*, 2001; Agerer *et al.*, 2005). Bei der Infektion von HEp-2 Zellen mit YadA_{pstb}aa26-253 erfolgte eine zeitabhängige Aktivierung der FAK, die der einer Infektion mit YadA_{pstb}-exprimierenden Bakterien stark ähnelte. Der Vergleich der von YadA_{pstb}aa26-253 und YadA_{pstb}Δ53-83 aa26-253 induzierten Phosphorylierung der FAK deutet auf eine leicht verzögerte und etwas schwächere Aktivierung durch die Kopf-/Nackendomäne des invasionsdefizienten Protein-derivates hin. Dies könnte einen ersten wichtigen Unterschied in der durch die beiden Proteinderivate ausgelösten Signaltransduktionskaskade darstellen. Da

eine Aktivierung der FAK auch allein durch die Bindung der Integrine an Komponenten der extrazellulären Matrix erfolgt (Hauck, 2002; Ilic *et al.*, 2004), war zu erwarten, dass die Bindung der beiden YadA-Kopf-Derivate ebenso zu einer Tyrosinphosphorylierung der Kinase führt. Versuche mit dominant negativen FAK-Varianten und FAK-defizienten Fibroblasten zeigten jedoch bereits, dass dieses Signalmolekül für die YadA-vermittelte Internalisation von besonderer Bedeutung ist (Eitel *et al.*, 2005). Die verzögerte Phosphorylierung durch YadA_{pstb}Δ53-83 aa26-253 könnte daher einen ersten Hinweis auf die Unterschiede der intrazellulären Signalkaskaden der Wirtszelle geben, die ursächlich für die verringerte Invasionsleistung sind.

Analysen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass die FAK einen essentiellen Faktor für die Induktion der IL-8-Sekretion durch YadA_{pstb} darstellt. Von besonderer Bedeutung für die YadA-vermittelte IL-8-Sekretion sind des Weiteren die ERK p44/42 Kinasen. Sie werden durch die beiden verkürzten YadA-Kopf-Derivate gleichermaßen aktiviert, wie es bei einer Infektion mit YadA_{pstb}-exprimierenden Bakterien zu beobachten ist. Trotzdem waren YadA_{pstb}aa26-253 und YadA_{pstb}Δ53-83 aa26-253 nicht in der Lage, die IL-8-Sekretion zu induzieren. Dies verdeutlicht, dass die Aktivierung der ERK p44/42 Kinasen allein nicht für die Induktion der IL-8-Sekretion ausreichend ist. Möglicherweise ist ein Zusammenspiel mit den ebenfalls in die Induktion der IL-8-Sekretion involvierten JNK und p38 Kinasen erforderlich (Eitel *et al.*, 2005). Für eine Beteiligung des JNK-Signalwegs spricht, dass dieser auch bei der durch das YopB-Protein der Yersinien induzierten IL-8-Sekretion aktiviert wird (Viboud *et al.*, 2003). Darüber hinaus sind offensichtlich entweder andere Domänen des YadA-Proteins oder weitere bakterielle Faktoren notwendig, um die Zytokinsynthese zu induzieren. Da sich das LPS der gramnegativen Bakterien stimulierend auf verschiedene Zellsignalwege auswirkt (Meng & Lowell, 1997; Backhed *et al.*, 2003), kann postuliert werden, dass es somit auch für die IL-8-Synthese eine aktivierende Funktion hat. Untersuchungen am grampositiven Bakterium *L. monocytogenes* konnte jedoch demgegenüber zeigen, dass allein die Infektion mit löslichem InlB ausreicht, um die IL-8-Ausschüttung zu stimulieren (Mansell *et al.*, 2001).

6. Zusammenfassung

Das afimbrilliäre Adhäsın YadA ist ein wichtiger Adhäsionsfaktor der enteropathogenen Bakterien *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica*. Es besitzt eine Vielzahl virulenzassoziierter Eigenschaften und trägt durch die Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) eukaryotischer Wirtszellen maßgeblich zur Etablierung einer Infektion bei. Obwohl die YadA-Proteine beider *Yersinia* spp. (YadA_{pstb} und YadA_{ent}) sehr homolog sind, vermittelt nur YadA_{pstb} eine effiziente Invasion in Epithelzellen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die YadA-Proteine hinsichtlich ihrer Virulenzeigenschaften zu vergleichen und sowohl bakterielle als auch zelluläre Determinanten zu identifizieren, die für die YadA_{pstb}-vermittelte Invasion von Bedeutung sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch funktionelle und strukturelle Analysen der YadA_{pstb}- und YadA_{ent}-Proteine gezeigt werden, dass eine in der N-terminalen Kopfregion des YadA_{pstb}-Proteins lokalisierte Region von 31 Aminosäuren, die dem YadA_{ent}-Protein fehlt, essentiell für die YadA_{pstb}-vermittelte Invasion ist. Die Deletion dieser Domäne in YadA_{pstb} (YadA_{pstb}Δ53-83) führt zu einem Verlust der Invasionsfähigkeit, während die adhäsiven Eigenschaften des Moleküls erhalten bleiben. Die Invasionsdomäne ist darüber hinaus für die aggregativen Eigenschaften und die Bindekapazität von YadA für Proteine der extrazellulären Matrix entscheidend. Ihr Fehlen in YadA_{pstb}Δ53-83 und YadA_{ent} bewirkt einen Verlust der Fähigkeit Auto- und Hämagglutination zu induzieren, vermittelt demgegenüber jedoch eine deutlich gesteigerte Bindung dieser YadA-Derivate an Kollagen und Laminin. YadA_{pstb} hingegen bindet hauptsächlich an Fibronectin, und es konnte nachgewiesen werden, dass die YadA_{pstb}-vermittelte Invasion nur auf Grundlage der Bindung an Fibronectin-gebundene $\alpha_5\beta_1$ -Integrine erfolgen kann. Die Invasionsdefizienz der YadA_{pstb}Δ53-83- und YadA_{ent}-Proteine ist demnach auf ihr verändertes EZM-Bindevverhalten an Kollagen und Laminin zurückzuführen, da diese an $\alpha\beta_1$ -Integrine binden, die nach bisherigen Erkenntnissen keine funktionelle Bedeutung für den Invasionsprozess haben.

Die Identifikation der YadA_{pstb}-Invasionsdomäne ermöglicht es, den Invasions- und Adhäsionsprozess deutlich voneinander abzugrenzen, so dass die Unterschiede der zu Grunde liegenden eukaryotischen Signaltransduktion

erstmalig untersucht werden können. Hierfür wurde in dieser Arbeit ein *in vitro*-System etabliert, das es aufgrund der Verwendung löslicher YadA-Proteinderivate erlaubt, die Aktivierung der Signalmoleküle in der Wirtszelle unbeeinflusst von anderen bakteriellen Faktoren zu analysieren. Ein weiterer Vorteil dieses Testsystems besteht darin, dass der Einsatz löslicher Proteine die Aktivierung aller oberflächenexponierten Integrin-Rezeptoren ermöglicht und die dadurch verstärkte YadA-vermittelte Signaltransduktion leichter nachweisbar ist. Die Identifikation invasionsspezifischer Signalwege kann somit in Zukunft deutlich vereinfacht erfolgen.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die invasiven und aggregativen Eigenschaften des YadA_{pstb}-Proteins für die effiziente Besiedlung tiefer gelegener Gewebe und Organe während der Infektion von Bedeutung sind. Die unterschiedlichen Virulenzeigenschaften der YadA_{pstb}- und YadA_{ent}-Proteine könnten somit eine Erklärung dafür sein, dass sich *Y. enterocolitica* im Gegensatz zu *Y. pseudotuberculosis* viel stärker extrazellulär vermehrt. Welchen Stellenwert die Kollagenbindung für die Pathogenität und Virulenz enteropathogener Yersinien einnimmt, kann im Rahmen weiterführender Untersuchungen anhand einer in dieser Arbeit konstruierten YadA-Kollagenmutante (YadA_{pstb} / Δ 53-83 V133D, N134A) analysiert werden.

7. Summary

The afimbrial adhesin YadA is the major adhesion factor of the enteropathogenic bacteria *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. It has multiple virulence-associated properties and contributes to the establishment of an infection by promoting tight adherence to extracellular matrix (ECM) proteins of the host cell. Although the YadA proteins of both *Yersinia* spp. (YadA_{pstb} and YadA_{ent}) are highly homologous, only YadA_{pstb} promotes efficient invasion into epithelial cells. The aim of this thesis was to compare the virulence properties of the YadA-proteins and to determine both bacterial and cellular factors involved in the YadA_{pstb}-mediated internalization.

Functional and structural analyses of YadA_{pstb} and YadA_{ent} revealed that a unique N-terminal region of 31 amino acids of YadA_{pstb}, which is absent in YadA_{ent}, is crucial for the YadA_{pstb}-mediated invasion. A deletion of this domain in YadA_{pstb} (YadA_{pstb}Δ53-83) abrogates cell invasion, while the adhesion remains unaffected. The uptake domain also affects the aggregation behaviour and the specificity of extracellular matrix substrate binding of YadA. The loss of this motif in YadA_{pstb}Δ53-83 and YadA_{ent} causes YadA variants, which are deficient in auto- and hemagglutination but promote strong binding to collagen and laminin. YadA_{pstb} however exhibits a high binding efficiency for fibronectin and it could be demonstrated that the YadA_{pstb}-mediated invasion occurs only via fibronectin-bound $\alpha_5\beta_1$ -integrins. The invasion-defective phenotype of YadA_{pstb}Δ53-83 and YadA_{ent} is therefore due to the changed ECM substrate binding of these proteins, because collagen and laminin bind to $\alpha\beta_1$ -integrins, for which so far no impact on the uptake process has been reported.

The identification of the uptake domain dissects invasion from adhesion and allows for the first time the analyses of the differences in the host cell signalling during these processes. For this purpose an *in vitro* system was developed, in which the application of soluble YadA protein-variants facilitates a by other bacterial factors unaffected analyses. An additional advantage of this system is, that the use of soluble proteins permits the activation of all surface-exposed integrin receptors and potentiates the YadA-mediated signalling. Thus the identification of invasion-specific signalling pathways is simplified for future analyses.

Furthermore, it was demonstrated that the invasive and aggregative properties of YadA_{pstb} contribute to the efficient colonization of deeper tissues and organs during infection. Therefore the differences in the virulence properties of YadA_{pstb} and YadA_{ent} might be responsible for the stronger extracellular replication of *Y. entero-colitica* compared to *Y. pseudotuberculosis*. To clarify to what extent the collagen binding ability plays a crucial role for the pathogenicity and virulence of enteropathogenic *Yersiniae*, analyses concerning the infection process should be continued by using the constructed collagen-binding defective mutant (YadA_{pstb} / Δ53-83 V133D, N134A).

8. Literaturverzeichnis

Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A., Carniel, E. (1999) *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 14043-8.

Achtman, M., Morelli, G., Zhu, P., Wirth, T., Diehl, I., Kusecek, B., Vogler, A.J., Wagner, D.M., Allender, C.J., Easterday, W.R., Chenal-Francisque, V., Worsham, P., Thomson, N.R., Parkhill, J., Lindler, L.E., Carniel, E., Keim, P. (2004) Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 17837-42.

Adkins, I., Koberle, M., Grobner, S., Bohn, E., Autenrieth, I.B., Borgmann, S. (2007) *Yersinia* outer proteins E, H, P, and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. Int J Med Microbiol 297: 235-44.

Agerer, F., Lux, S., Michel, A., Rohde, M., Ohlsen, K., Hauck, C.R. (2005) Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalisation. J Cell Sci 118: 2189-200.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2005) Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Alrutz, M.A., Isberg, R.R. (1998) Involvement of focal adhesion kinase in invasion-mediated uptake. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 13658-63.

Altroff, H., Choulier, L., Mardon, H.J. (2003) Synergistic activity of the ninth and tenth FIII domains of human fibronectin depends upon structural stability. J Biol Chem 278: 491-7.

Autenrieth, I.B., Firsching, R. (1996) Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. J Med Microbiol 44: 285-94.

Backhed, F., Normark, S., Schweda, E.K., Oscarson, S., Richter-Dahlfors, A. (2003) Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. Microbes Infect 5: 1057-63.

Baggiolini, M., Clark-Lewis, I. (1992) Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. FEBS Lett 307: 97-101.

Balligand, G., Laroche, Y., Cornelis, G. (1985) Genetic analysis of virulence plasmid from a serogroup 9 *Yersinia enterocolitica* strain: role of outer membrane protein P1 in resistance to human serum and autoagglutination. Infect Immun 48:782-6.

Barocchi, M.A., Massignani, V., Rappuoli, R. (2005) Opinion: Cell entry machines: a common theme in nature? Nat Rev Microbiol 3: 349-58.

Barnes, P.D., Bergman, M.A., Mecsas, J., Isberg R.R. (2006) *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. J Exp Med 203:1591-601.

Betis, F., Brest, P., Hofman, V., Guignot, J., Bernet-Camard, M.F., Rossi, B., Servin, A., Hofman, P. (2003) The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. Infect Immun

71: 1068-74.

Biedzka-Sarek, M., Venho, R., Skurnik, M. (2005) Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. Infect Immun 73: 2232-44.

Blackmore, T.K., Fischetti, V.A., Sadlon, T.A., Ward, H.M., Gordon, D.L.. (1998) M protein of the group A *Streptococcus* binds to the seventh short consensus repeat of human complement factor H. Infect Immun 66: 1427-31.

Bleves, S., Cornelis, G.R. (2000) How to survive in the host: the *Yersinia* lesson. Microbes Infect 2:1451-60.

Bliska, J. B., and Falkow, S. (1992). Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 3561-5.

Bliska, J.B., Copass, M.C., Falkow, S. (1993) The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEP-2 cells. Infect Immun 61: 3914-21.

Bockemühl, J. (2002) *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis*. In Baumgart J (Hrsg) Mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln, Behr's Verlag, Hamburg.

Bockemühl, J. und Roggentin, P. (2004) Enterale Yersiniosen, Klinische Bedeutung, Epidemiologie, Diagnostik und Prävention. Bundesgesundheitsblatt–Gesundheitsforschung–Gesundheitsschutz 7: 685-691.

Bockman, D.E., Cooper, M.D. (1973) Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. Am J Anat 136: 455-77.

Bolin, I., Norlander, L., Wolf-Watz, H. (1982) Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. Infect Immun 37: 506-12.

Bolin, I., Wolf-Watz, H. (1984) Molecular cloning of the temperature-inducible outer membrane protein 1 of *Yersinia pseudotuberculosis*. Infect Immun 43: 72-8.

Bosman, F.T., Stamenkovic, I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. J Pathol 200: 423-8.

Bottone, E.J., Robin, T. (1977) *Yersinia enterocolitica*: recovery and characterization of two unusual isolates from a case of acute enteritis. J Clin Microbiol 5: 341-5.

Bottone, E.J. (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. Clin Microbiol Rev 10: 257-76.

Boyle, E.C., Finlay, B.B. (2003) Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. Curr Opin Cell Biol 15: 633-9.

Bruce-Staskal, P.J., Weidow, C.L., Gibson, J.J., Bouton, A.H. (2002) Cas, Fak and Pyk2 function in diverse signaling cascades to promote *Yersinia* uptake. J Cell Sci 115: 2689-700.

- Bukholm, G., Kapperud, G., Skurnik, M. (1990) Genetic evidence that the *yopA* gene-encoded *Yersinia* outer membrane protein Yop1 mediates inhibition of the anti-invasive effect of interferon. *Infect Immun* 58: 2245-51.
- Cathelyn, J.S., Crosby, S.D., Lathem, W.W., Goldman, W.E., Miller, V.L. (2006) RovA, a global regulator of *Yersinia pestis*, specifically required for bubonic plague. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13514-9.
- Chai, P.S., Carniel, E., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Stoutland, P.O., Regala, W.M., Georgescu, A.M., Vergez, L.M., Land, M.L., Motin, V.L., Brubaker, R.R., Fowler, J., Hinnebusch, J., Marceau, M., Medigue, C., Simonet, M., Chenal-Francisque, V., Souza, B., Dacheux, D., Elliott, J.M., Derbise, A., Hauser, L.J., Garcia, E. (2004) Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13826-31.
- China, B., Sory, M.P., N'Guyen, B.T., de Bruyere, M., Cornelis, G.R. (1993) Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect Immun* 61: 3129-36.
- China, B., N'Guyen, B.T., de Bruyere, M., Cornelis, G.R. (1994) Role of YadA in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 62: 1275-81.
- Clark, M.A., Hirst, B.H., Jepson, M.A. (1998) M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* 66:1237-43.
- Cornelis, G.R., Sluiter, C., Delor, I., Geib, D., Kaniga, K., Lambert de Rouvroit, C., Sory, M. P., Vanootehem, J. C., and Michiels, T. (1991) *ymoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Mol Microbiol* 5: 1023-34.
- Cornelis, G.R. (1993) Role of the transcription activator *virF* and the histone-like protein YmoA in the thermoregulation of virulence functions in *yersiniae*. *Zentralbl Bakteriell* 278: 149-64.
- Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.P., Stainier, I. (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998 62: 1315-52.
- Cornelis, G.R. (2002) The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 742-52.
- Cossart, P., Sansonetti, P.J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304: 242-8.
- Cotter, S.E., Surana, N.K., St Geme, J.W. 3rd. (2005) Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 13: 199-205.
- Cotter, S.E., Surana, N.K., Grass, S., St Geme, J.W. 3rd. (2006) Trimeric autotransporters require trimerization of the passenger domain for stability and adhesive activity. *J Bacteriol* 188: 5400-7.
- Cover, T.L., Aber, R.C. (1989) *Yersinia enterocolitica*. *N Engl J Med* 32: 16-24.

- Derbise, A., Lesic, B., Dacheux, D., Ghigo, J.M., Carniel, E. (2003) A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. FEMS Immunol Med Microbiol 38: 113-6.
- Dersch, P., Isberg, R.R. (1999) A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. EMBO J 18: 1199-213.
- Dersch, P., Isberg, R.R. (2000) An immunoglobulin superfamily-like domain unique to the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein is required for stimulation of bacterial uptake via integrin receptors. Infect Immun 68: 2930-8.
- Dinkla, K., Rohde, M., Jansen, W.T., Kaplan, E.L., Chhatwal, G.S., Talay, S.R. (2003a) Rheumatic fever-associated *Streptococcus pyogenes* isolates aggregate collagen. J Clin Invest 111: 1905-12.
- Dinkla, K., Rohde, M., Jansen, W.T., Carapetis, J.R., Chhatwal, G.S., Talay, S.R. (2003b) *Streptococcus pyogenes* recruits collagen via surface-bound fibronectin: a novel colonization and immune evasion mechanism. Mol Microbiol 47: 861-9.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 15: 167-93.
- Dube, P.H., Handley, S.A., Revell, P.A., Miller, V.L. (2003) The *rovA* mutant of *Yersinia enterocolitica* displays differential degrees of virulence depending on the route of infection. Infect Immun 71: 3512-20.
- Eble, J.A. & Kühn, K. (1997) Integrin-Ligand Interaction. Springer, Landes, Austin; TX.
- Eckmann, L., Kagnoff, M. F., and Fierer, J. (1995) Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. Trends Microbiol 3: 118-20.
- Eitel, J., Dersch, P. (2002) The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. Infect Immun 70: 4880-91.
- Eitel, J., Heise, T., Thiesen, U., Dersch, P.. (2005) Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YadA of *Yersinia pseudotuberculosis* require common signalling molecules (FAK, c-Src, Ras) and distinct cell factors. Cell Microbiol 7: 63-77.
- El Tahir, Y., Skurnik, M. (2001) YadA, the multifaceted *Yersinia* adhesin. Int J Med Microbiol 291: 209-18.
- Elasri, M.O., Thomas, J.R., Skinner, R.A., Blevins, J.S., Beenken, K.E., Nelson, C.L., Smeltzer, M.S. (2002) *Staphylococcus aureus* collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. Bone 30: 275-80.
- Elkins, C., Morrow, K.J.Jr., Olsen, B. (2000) Serum resistance in *Haemophilus ducreyi* requires outer membrane protein DsrA. Infect Immun 68: 1608-19.
- Ellison, D.W., Lawrenz, M.B., Miller, V.L. (2004) Invasin and beyond: regulation of *Yersinia* virulence by RovA. Trends Microbiol 12: 296-300.
- Emödy, L., Heesemann, J., Wolf-Watz, H., Skurnik, M., Kapperud, G., O'Toole, P., and Wadstrom, T. (1989) Binding to collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia*

pseudotuberculosis: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms. J Bacteriol 171: 6674-9.

Eyre, D.R. (2004) Collagens and cartilage matrix homeostasis. Clin Orthop Relat Res 427: S118-22.

Fernandez, R.C., Weiss, A.A. (1994) Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. Infect Immun 62: 4727-38.

Fink, D.L., Green, B.A., St Geme, J.W. 3rd. (2002) The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. Infect Immun 70: 4902-7.

Fink, D.L., Buscher, A.Z., Green, B., Fernsten, P., St Geme, J.W. 3rd. (2003) The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-terminal end of the passenger domain. Cell Microbiol 5: 175-86.

Flügel, A., Schulze-Koops, H., Heesemann, J., Kuhn, K., Sorokin, L., Burkhardt, H., von der Mark, K., Emmrich, F. (1994) Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. J Biol Chem 269: 29732-8.

Gewirtz, A.T., Simon, P.O. Jr, Schmitt, C.K., Taylor, L.J., Hagedorn, C.H., O'Brien, A.D., Neish, A.S., Madara, J.L. (2001) *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. J Clin Invest 107: 99-109.

Giancotti, F.G., Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. Science 285: 1028-32.

Ginsberg, M.H., Du, X., Plow, E.F. (1992) Inside-out integrin signalling. Curr Opin Cell Biol 4: 766-71.

Gripenberg-Lerche, C., Skurnik, M., Toivanen, P. (1995) Role of YadA-mediated collagen binding in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: experimental studies with rats. Infect Immun 63: 3222-6.

Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M.P., Cornelis, G.R. (2002) Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. Infect Immun 70: 4165-76.

Grutzkau, A., Hanski, C., Hahn, H., and Riecken, E. O. (1990) Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. Gut 31: 1011-5.

Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. J Bacteriol 177: 4121-4130.

Hanski, C., Naumann, M., Hahn, H., and Riecken, E.O. (1989) Determinants of invasion and survival of *Yersinia enterocolitica* in intestinal tissue. An in vivo study. Med Microbiol Immunol 178: 289-96.

Hamburger, Z.A., Brown, M.S., Isberg, R.R., Bjorkman, P.J. (1999) Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. Science 286: 291-5.

Han, Y.W., Miller, V.L. (1997) Reevaluation of the virulence phenotype of the *inv yadA* double mutants of *Yersinia pseudotuberculosis*. Infect Immun 65: 327-30.

- Hauck, C.R. (2002) Cell adhesion receptors - signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. *Med Microbiol Immunol* 191: 55-62.
- Hauck, C.R., Meyer, T.F. (2003) 'Small' talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host-cell communication. *Curr Opin Microbiol* 6: 43-9.
- Hauck, C.R., Ohlsen, K. (2006) Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol* 9: 5-11.
- Hauck, C.R., Agerer, F., Muenzner, P., Schmitter, T. (2006) Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection. *Eur J Cell Biol* 85: 235-42.
- Heesemann, J., and Grüter, L. (1987) Genetic evidence that the outer membrane protein YOP1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEBS Microbiol Lett* 40: 37-41.
- Heesemann, J., Sing, A., Trulzsch, K. (2006) *Yersinia*'s stratagem: targeting innate and adaptive immune defense. *Curr Opin Microbiol* 9: 55-61.
- Hellwage, J., Meri, T., Heikkilä, T., Alitalo, A., Panelius, J., Lahdenne, P., Seppälä, I.J., Meri, S. (2001) The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem* 276: 8427-35.
- Hendrixson, D.R., St Geme, J.W. 3rd. (1998) The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein. *Mol Cell* 2: 841-50.
- Heroven, A.K., Nagel, G., Tran, H.J., Parr, S., Dersch, P. (2004) RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasins and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* 53: 871-88.
- Hocking, D.C., Sottile, J., McKeown-Longo, P.J. (1998) Activation of distinct $\alpha 5 \beta 1$ -mediated signaling pathways by fibronectin's cell adhesion and matrix assembly domains. *J Cell Biol* 141: 241-53.
- Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., Heesemann, J. (2000) Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* 19: 5989-99.
- Hoe, N.P., Goguen, J.D. (1993) Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J Bacteriol* 175: 7901-9.
- Holmstrom, A., Rosqvist, R., Wolf-Watz, H., Forsberg, A. (1995). Virulence plasmid-encoded YopK is essential for *Yersinia pseudotuberculosis* to cause systemic infection in mice. *Infect Immun* 63: 2269-76.
- Hook, M., Switalski, L.M., Wadstrom, T., Lindberg, M. (1989) Interactions of pathogenic microorganisms with fibronectin. In Mosher DF (ed.). *Fibronectin*, Academic Press, San Diego, CA, 295–308.
- House-Pompeo, K., Xu, Y., Joh, D., Speziale, P., Hook, M. (1996) Conformational changes in the fibronectin binding MSCRAMMs are induced by ligand binding. *J Biol Chem* 271: 1379-84.
- Huang, X.Z., Lindler, L.E. (2004) The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced

by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen. Infect Immun 72: 7212-9.

Hudson, K.J., Bliska, J.B., Bouton, A.H. (2005) Distinct mechanisms of integrin binding by *Yersinia pseudotuberculosis* adhesins determine the phagocytic response of host macrophages. Cell Microbiol 7: 1474-89.

Hughes, P.E., Pfaff, M. (1998) Integrin affinity modulation. Trends Cell Biol 8: 359-64.

Humphries, M.J. (2000) Integrin structure. Biochem Soc Trans 28: 311-39.

Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 69:11-25.

Hynes, R.O. (1999) Cell adhesion: old and new questions. Trends Cell Biol 9: M33-7.

Hynes, R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 110:673-87.

Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., Yamamoto, T. (1995) Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. Nature 377: 539-44.

Ilic, D., Damsky, C.H., Yamamoto, T. (1997) Focal adhesion kinase: at the crossroads of signal transduction. J Cell Sci 110: 401-7.

Ilic, D., Kovacic, B., Johkura, K., Schlaepfer, D.D., Tomasevic, N., Han, Q., Kim, J.B., Howerton, K., Baumbusch, C., Ogiwara, N., Streblow, D.N., Nelson, J.A., Dazin, P., Shino, Y., Sasaki, K., Damsky, C.H. (2004) FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. J Cell Sci 117:177-87.

Isberg, R.R. (1989) Mammalian cell adhesion functions and cellular penetration of enteropathogenic *Yersinia* species. Mol Microbiol 3: 1449-53.

Isberg, R.R. (1996) Uptake of enteropathogenic *Yersinia* by mammalian cells. Curr Top Microbiol Immunol 209: 1-24.

Isberg, R.R., and Falkow, S. (1985) A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. Nature 317: 262-4.

Isberg, R.R., Swain, A., Falkow, S. (1988) Analysis of expression and thermoregulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* *inv* gene with hybrid proteins. Infect Immun 56: 2133-8.

Isberg, R.R., Leong, J.M. (1990) Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. Cell 60: 861-71.

Isberg, R.R., Hamburger, Z., Dersch, P.. (2000) Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. Microbes Infect 2: 793-801.

Jackson, M.W., Silva-Herzog, E., Plano, G.V. (2004) The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the *Yersinia pestis* type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein. Mol Microbiol. 54 1364-78.

Jeng, A., Sakota, V., Li, Z., Datta, V., Beall, B., Nizet, V. (2003) Molecular genetic analysis of a group A *Streptococcus* operon encoding serum opacity factor and a novel fibronectin-binding protein, SfbX. J Bacteriol 185: 1208-17.

- Joh, D., Speziale, P., Gurusiddappa, S., Manor, J., Hook, M. (1998) Multiple specificities of the staphylococcal and streptococcal fibronectin-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules. *Eur J Biochem* 258: 897-905.
- Joh, D., Wann, E.R., Kreikemeyer, B., Speziale, P., Hook, M. (1999) Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol* 18: 211-23.
- Jung, H.C., Eckmann, L., Yang, S.K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., Kagnoff, M.F. (1995) A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 95: 55-65.
- Kapperud, G., Namork, E., Skarpeid, H.J. (1985) Temperature-inducible surface fibrillae associated with the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 47: 561-6.
- Kerschen, E.J., Cohen, D.A., Kaplan, A.M., Straley, S.C. (2004) The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells. *Infect Immun* 72: 4589-602.
- Konkel, M.E., Tilly, K. (2000) Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect* 2: 157-66.
- Kukkonen, M., Raunio, T., Virkola, R., Lahteenmaki, K., Makela, P. (1993) Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin. *Mol Microbiol* 7: 229-37.
- Lacoste, M.G., Tamashiro, H., Correa, S.G., de Guzman, A.M., Di Genaro, M.S. (2007) Correlation between *Yersinia enterocolitica* and type I collagen reactivity in patients with arthropathies. *Rheumatol Int* 27: 613-20.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Lambert de Rouvroit, C., Sluiter, C., Cornelis, G. R. (1992). Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 6 395-409.
- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J., Cossart, P. (1997) Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun* 65: 5309-19.
- Leong, J.M., Morrissey, P.E., Isberg, R.R. (1993) A 76-amino acid disulfide loop in the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein is required for integrin receptor recognition. *J Biol Chem* 268: 20524-32.
- Leong, J.M., Morrissey, P.E., Marra, A., Isberg, R.R. (1995) An aspartate residue of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein that is critical for integrin binding. *EMBO J* 14: 422-31.
- Linke, D., Riess, T., Autenrieth, I.B., Lupas, A., Kempf, V.A. (2006) Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol* 14: 264-70.
- Löffler, G., Petrides, P., Heinrich, P.C. (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

- Manoil, C., Beckwith, J. (1986) A genetic approach to analyzing membrane protein topology. *Science* 233: 1403-8.
- Marra, A., and Isberg, R. R. (1996). Analysis of the role of invasin during *Yersinia pseudotuberculosis* infection of mice. *Ann N Y Acad Sci* 797: 290-2.
- Marra, A., Isberg, R.R. (1997) Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infect Immun* 65: 3412-21.
- Marsh, J.W., Taylor, R.K. (1999) Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. *J Bacteriol* 181: 1110-7.
- McCormick, B.A., Nusrat, A., Parkos, C.A., D'Andrea, L., Hofman, P.M., Carnes, D., Liang, T.W., Madara, J.L. (1997) Unmasking of intestinal epithelial lateral membrane beta1 integrin consequent to transepithelial neutrophil migration in vitro facilitates inv-mediated invasion by *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 65: 1414-21.
- McElroy, M.C., Cain, D.J., Tyrrell, C., Foster, T.J, Haslett, C. (2002) Increased virulence of a fibronectin-binding protein mutant of *Staphylococcus aureus* in a rat model of pneumonia. *Infect Immun* 70: 3865-73.
- Menard, R., Prevost, M.C., Gounon, P., Sansonetti, P., Dehio, C. (1996) The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1254-8.
- Meng, F., Lowell, C.A. (1997) Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med* 185: 1661-70.
- Miller, J.H. (1992) A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller, V.L. (1992) *Yersinia* invasion genes and their products, *ASM News* 58: 26-33
- Miller, V.L., and Falkow, S. (1988) Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 56: 1242-8.
- Miller, V.L., Mekalanos, J.J. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol* 170: 2575-83.
- Miller, V.L., Farmer, J.J. 3rd., Hill, W.E., and Falkow, S. (1989) The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect Immun* 57: 121-31.
- Molinari, G., Talay, S.R., Valentin-Weigand, P., Rohde, M., Chhatwal, G.S. (1997) The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun* 65: 1357-63.
- Mosher, D.F., Proctor, R.A. (1980) Binding and factor XIIIa-mediated cross-linking of a 27-kilodalton fragment of fibronectin to *Staphylococcus aureus*. *Science* 209: 927-9.
- Nagel, G., Lahrz, A., Dersch, P. (2001) Environmental control of invasin expression in

Yersinia pseudotuberculosis is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family. Mol Microbiol 41: 1249-69.

Naktin, J., Beavis, K.G. (1999) *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Clin Lab Med 19: 523-36.

Nguyen, N.M., Senior, R.M. (2006) Laminin isoforms and lung development: all isoforms are not equal. Dev Biol 294: 271-9.

Niemann, H.H., Schubert, W.D., Heinz, D.W. (2004) Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. Microbes Infect 6: 101-12.

Nummelin, H., Merckel, M.C., Leo, J.C., Lankinen, H., Skurnik, M., Goldman, A. (2004) The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. EMBO J 23: 701-11.

Nyberg, P., Sakai, T., Cho, K.H., Caparon, M.G., Fassler, R., Bjorck, L. (2004) Interactions with fibronectin attenuate the virulence of *Streptococcus pyogenes*. EMBO J 23: 2166-74.

Oellerich, M.F., Jacobi, C.A., Freund, S., Niedung, K., Bach, A., Heesemann, J., Trulzsch, K. (2007) *Yersinia enterocolitica* infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. Infect Immun 75: 3802-11.

Oelschlaeger, T.A. (2001) Adhesins as invasins. Int J Med Microbiol 291: 7-14.

Ozeri, V., Tovi, A., Burstein, I., Natanson-Yaron, S., Caparon, M.G., Yamada, K.M., Akiyama, S.K., Vlodavsky, I., Hanski, E. (1996) A two-domain mechanism for group A streptococcal adherence through protein F to the extracellular matrix. EMBO J 15: 989-98.

Ozeri, V., Rosenshine, I., Ben-Ze'Ev, A., Bokoch, G.M., Jou, T.S., Hanski, E. (2001) De novo formation of focal complex-like structures in host cells by invading *Streptococci*. Mol Microbiol 41: 561-73.

Paez, M.C., Gonzalez, M.J., Serrano, N.C., Shoenfeld, Y., Anaya, J.M. (2007) Physiological and pathological implications of laminins: from the gene to the protein. Autoimmunity 40: 83-94.

Parkhill, J., Thomson, N. (2003) Evolutionary strategies of human pathogens. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 68: 151-8.

Parsons, J.T., Martin, K.H., Slack, J.K., Taylor, J.M., Weed, S.A. (2000) Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. Oncogene 19: 5606-13.

Patti, J.M., Hook, M. (1994) Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. Curr Opin Cell Biol 6: 752-8.

Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., Hook, M. (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu Rev Microbiol 48: 585-617.

Pearson, M.M., Lafontaine, E.R., Wagner, N.J., St Geme, J.W. 3rd, Hansen, E.J. (2002) A hag mutant of *Moraxella catarrhalis* strain O35E is deficient in hemagglutination, autoagglutination, and immunoglobulin D-binding activities. Infect Immun 70: 4523-33.

- Pepe, J.C., Miller, V.L. (1993) *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 6473-7.
- Pepe, J. C., Badger, J. L., Miller, V. L. (1994) Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene. Mol Microbiol 11: 123-35.
- Pepe, J.C., Wachtel, M.R., Wagar, E., Miller, V.L. (1995) Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. Infect Immun 63: 4837-48.
- Pettersson, J., Nordfelth, R., Dubinina, E., Bergman, T., Gustafsson, M., Magnusson, K.E., Wolf-Watz, H. (1996) Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. Science 273: 1231-3.
- Pierson, D.E., Falkow, S. (1993) The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. Infect Immun 61:1846-52.
- Pilz, D., Vocke, T., Heesemann, J., Brade, V. (1992) Mechanism of YadA-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O3. Infect Immun 60: 189-95.
- Pizarro-Cerda, J., Cossart, P. (2006) Bacterial adhesion and entry into host cells. Cell 124: 715-27.
- Plancon, L., Du Merle, L., Le Friec, S., Gounon, P., Jouve, M., Guignot, J., Servin, A., Le Bouguenec, C. (2003) Recognition of the cellular beta1-chain integrin by the bacterial AfaD invasin is implicated in the internalization of afa-expressing pathogenic *Escherichia coli* strains. Cell Microbiol 5: 681-93.
- Preissner, K.T., Chhatwal, G.S. (1999) Extracellular matrix (ECM) and Host Cell Surfaces: Potential sites of pathogen interaction. Cellular Microbiology (ed. Cossart P) ASM Press, Washington, DC, USA, 49–65.
- Raibaud, S., Schwarz-Linek, U., Kim, J.H., Jenkins, H.T., Baines, E.R., Gurusiddappa, S., Hook, M., Potts, J.R. (2005) *Borrelia burgdorferi* binds fibronectin through a tandem beta-zipper, a common mechanism of fibronectin binding in staphylococci, streptococci, and spirochetes. J Biol Chem 280: 18803-9.
- Ramamurthi, K.S., Schneewind, O. (2003) Substrate recognition by the *Yersinia* type III protein secretion machinery. Mol Microbiol 50: 1095-102.
- Redick, S.D., Settles, D.L., Briscoe, G., Erickson, H.P. (2000) Defining fibronectin's cell adhesion synergy site by site-directed mutagenesis. J Cell Biol 149: 521-7.
- Revell, P.A., Miller, V.L. (2000) A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. Mol Microbiol 35: 677-85.
- Rhem, M.N., Lech, E.M., Patti, J.M., McDevitt, D., Hook, M., Jones, D.B., Wilhelmus, K.R. (2000) The collagen-binding adhesin is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* keratitis. Infect Immun 68: 3776-9.
- Rich, R.L., Deivanayagam, C.C., Owens, R.T., Carson, M., Hook, A., Moore, D., Symersky, J., Yang, V.W., Narayana, S.V., Hook M. (1999a) Trench-shaped binding sites promote multiple classes of interactions between collagen and the adherence receptors, alpha(1)beta(1) integrin and *Staphylococcus aureus* cna MSCRAMM. J Biol Chem 274: 24906-13.

- Rich, R.L., Kreikemeyer, B., Owens, R.T., LaBrenz, S., Narayana, S.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E., Hook, M. (1999b) Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. J Biol Chem 274: 26939-45.
- Roggenkamp, A., Neuberger, H.R., Flugel, A., Schmoll, T., Heesemann, J. (1995) Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. Mol Microbiol 16: 1207-19.
- Roggenkamp, A., Ruckdeschel, K., Leitritz, L., Schmitt, R., Heesemann, J. (1996) Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. Infect Immun 64: 2506-14.
- Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C.A., Trulzsch, K., Hoffmann, H., Heesemann, J. (2003) Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. J Bacteriol 185: 3735-44.
- Rosqvist, R., Wolf-Watz, H. (1986) Virulence plasmid-associated HeLa cell induced cytotoxicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. Microb Pathog 1: 229-40.
- Rosqvist, R., Magnusson, K.E., Wolf-Watz, H. (1994) Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. EMBO J 13: 964-72.
- Ruckdeschel, K., Roggenkamp, A., Schubert, S., Heesemann, J. (1996) Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. Infect Immun 64: 724-33.
- Ruckdeschel, K., Mannel, O., Richter, K., Jacobi, C.A., Trulzsch, K., Rouot, B., Heesemann, J. (2001) *Yersinia* outer protein P of *Yersinia enterocolitica* simultaneously blocks the nuclear factor-kappa B pathway and exploits lipopolysaccharide signaling to trigger apoptosis in macrophages. J Immunol 166: 1823-31.
- Ruiz, T., Lenox, C., Radermacher, M., Mintz, K.P. (2006) Novel surface structures are associated with the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. Infect Immun 74: 6163-70.
- Ruoslahti, E. (1985) Fibronectin and its receptors. Annu Rev Biochem 57: 375-413.
- Saltman, L.H., Lu, Y., Zaharias, E.M., Isberg, R.R. (1996) A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein that contributes to high affinity binding to integrin receptors. J Biol Chem 271: 23438-44.
- Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R., Parsons, J.T. (1994) Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. Mol Cell Biol 14: 1680-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press.
- Scharf, S. (2004) Diplomarbeit, Freie Universität Berlin
- Schlaepfer, D.D., Hunter, T. (1997) Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. J Biol Chem 272: 13189-95.

- Schmid, Y., Grassl, G.A., Buhler, O.T., Skurnik, M., Autenrieth, I.B., Bohn, E. (2004) *Yersinia enterocolitica* adhesin A induces production of interleukin-8 in epithelial cells. *Infect Immun* 72: 6780-9.
- Schulte, R., Grassl, G.A., Preger, S., Fessele, S., Jacobi, C.A., Schaller, M., Nelson, P.J., Autenrieth, I.B. (2000) *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J* 14: 1471-84.
- Schulze-Koops, H., Burkhardt, H., Heesemann, J., von der Mark, K., Emmrich, F. (1992) Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic *yersiniae* to various types of collagen. *Infect Immun* 60: 2153-9.
- Schwarz-Linek, U., Hook, M., Potts, J.R. (2006) Fibronectin-binding proteins of gram-positive cocci. *Microbes Infect* 8: 2291-8.
- Scibelli, A., Roperto, S., Manna, L., Pavone, L.M., Tafuri, S., Della Morte, R., Staiano, N. (2007) Engagement of integrins as a cellular route of invasion by bacterial pathogens. *Vet J* 173:482-91.
- Selvarangan, R., Goluszko, P., Singhal, J., Carnoy, C., Moseley, S., Hudson, B., Nowicki, S., Nowicki, B.. (2004) Interaction of Dr adhesin with collagen type IV is a critical step in *Escherichia coli* renal persistence. *Infect Immun* 72: 4827-35.
- Servin, A.L. (2005) Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 18: 264-92.
- Simon, R., Priefer, U., Puehler, A. (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology* 1: 784-791.
- Skurnik, M., Bolin, I., Heikkinen, H., Piha, S., Wolf-Watz, H. (1984) Virulence plasmid associated autoagglutination in *Yersinia* spp. *J Bacteriol* 158: 1033-6.
- Skurnik, M. (1985) Expression of antigens encoded by the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* under different growth conditions. *Infect Immun* 47: 183-190.
- Skurnik, M., Wolf-Watz, H. (1989) Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol* 3: 517-29.
- Skurnik, M., Toivanen, P. (1992) LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 174: 2047-51.
- Straley, S.C., Skrzypek, E., Plano, G.V., Bliska, J.B. (1993) Yops of *Yersinia* spp. Pathogenic for humans. *Infect Immun* 61: 3105-10.
- Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113-30.
- Suzuki, N., Yokoyama, F., Nomizu, M. (2005) Functional sites in the laminin alpha chains. *Connect Tissue Res* 46: 142-52.
- Swanson. M.S., Isberg, R.R.. (1995) Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun* 63: 3609-20.

- Symersky, J., Patti, J.M., Carson, M., House-Pompeo, K., Teale, M., Moore, D., Jin, L., Schneider, A., DeLucas, L.J., Hook, M., Narayana, S.V. (1997) Structure of the collagen-binding domain from a *Staphylococcus aureus* adhesin. *Nat Struct Biol* 4: 833-8.
- Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., de Pereda, J.M., Ginsberg, M.H., Calderwood, D.A. (2003) Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302: 103-6.
- Tahir, Y.E., Kuusela, P., Skurnik, M. (2000) Functional mapping of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. Identification of eight NSVAIG - S motifs in the amino-terminal half of the protein involved in collagen binding. *Mol Microbiol* 37: 192-206.
- Tamm, A., Tarkkanen, A.M., Korhonen, T.K., Kuusela, P., Toivanen, P., Skurnik, M. (1993) Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the YadA protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 10: 995-1011.
- Talay, S.R., Zock, A., Rohde, M., Molinari, G., Oggioni, M., Pozzi, G., Guzman, C.A., Chhatwal, G.S. (2000) Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell Microbiol* 2: 521-35.
- Tertti, R., Skurnik, M., Vartio, T., Kuusela, P.. (1992) Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect Immun* 60: 3021-4.
- Thiefes, A., Wolf, A., Doerrie, A., Grassl, G.A., Matsumoto, K., Autenrieth, I.B., Bohn, E., Sakurai, H., Niedenthal, R., Resch, K., Kracht, M. (2006) The *Yersinia enterocolitica* effector YopP inhibits host cell signalling by inactivating the protein kinase TAK1 in the IL-1 signalling pathway. *EMBO Rep* 7: 838-44.
- Tran Van Nhieu, G., Isberg, R.R. (1993) Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. *EMBO J* 12: 1887-95.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24: 145-9.
- van der Flier, A., Sonnenberg, A. (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305: 285-98.
- Vazquez-Torres, A., Fang, F.C. (2000) Cellular routes of invasion by enteropathogens. *Curr Opin Microbiol* 3: 54-9.
- Viboud, G.I., So, S.S., Ryndak, M.B., Bliska, J.B. (2003) Proinflammatory signalling stimulated by the type III translocation factor YopB is counteracted by multiple effectors in epithelial cells infected with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* 47: 1305-15.
- Viboud, G.I., Bliska, J.B. (2005) *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 59: 69-89.
- Virji, M., Makepeace, K., Moxon, E.R. (1994) Distinct mechanisms of interactions of Opc-expressing meningococci at apical and basolateral surfaces of human endothelial cells; the role of integrins in apical interactions. *Mol Microbiol* 14: 173-84.

- Virkola, R., Brummer, M., Rauvala, H., van Alphen, L., Korhonen, T.K. (2000) Interaction of fimbriae of *Haemophilus influenzae* type B with heparin-binding extracellular matrix proteins. *Infect Immun* 68: 5696-701.
- Wachtel, M.R., Miller, V.L. (1995) In vitro and in vivo characterization of an *ail* mutant of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 63: 2541-8.
- Watarai, M., Funato, S., Sasakawa, C. (1996) Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J Exp Med* 183: 991-9.
- Wattiau, P., Bernier, B., Deslee, P., Michiels, T., Cornelis, G.R. (1994) Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10493-7.
- Wiedemann, A., Linder, S., Grassl, G., Albert, M., Autenrieth, I., Aepfelbacher, M. (2001) *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. *Cell Microbiol* 3: 693-702.
- Wilson, J.J., Matsushita, O., Okabe, A., Sakon, J. (2003) A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation. *EMBO J* 22: 1743-52.
- Wong, K.W., Isberg, R.R. (2005) Emerging views on integrin signaling via Rac1 during invasin-promoted bacterial uptake. *Curr Opin Microbiol* 8: 4-9.
- Wren, B.W. (2003) The *yersiniae*--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 1: 55-64.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S.L., Arnaout, M.A. (2002) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alphaVbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 296: 151-5.
- Yang, Y., Merriam, J.J., Mueller, J.P., Isberg, R.R. (1996) The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. *Infect Immun* 64: 2483-9.
- Yang, Y., Isberg, R.R. (1997) Transcriptional regulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* pH6 antigen adhesin by two envelope-associated components. *Mol Microbiol* 24: 499-510.
- Young, V.B., Miller, V.L., Falkow, S., Schoolnik, G.K. (1990) Sequence, localization and function of the invasin protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 4: 1119-28.
- Zamir, E., Katz, M., Posen, Y., Erez, N., Yamada, K.M., Katz, B.Z., Lin, S., Lin, D.C., Bershadsky, A., Kam, Z., Geiger, B. (2000) Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2: 191-196.
- Zauberman, A., Cohen, S., Mamroud, E., Flashner, Y., Tidhar, A., Ber, R., Elhanany, E., Shafferman, A., Velan, B. (2006) Interaction of *Yersinia pestis* with macrophages: limitations in YopJ-dependent apoptosis. *Infect Immun* 74: 3239-50.
- Zhang, P., Chomel, B.B., Schau, M.K., Goo, J.S., Droz, S., Kelminson, K.L., George, S.S., Lerche, N.W., Koehler, J.E. (2004) A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13630-5.

Zong, Y., Xu, Y., Liang, X., Keene, D.R., Hook, A., Gurusiddappa, S., Hook, M., Narayana, S.V. (2005) A 'Collagen Hug' model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. EMBO J 24: 4224-36.